

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE
Baccharis trimera EM RATAS PRENHES E SEUS
CONCEPTOS**

Simone Reschke Mendes Grance

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
ABRIL DE 2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE
Baccharis trimera EM RATAS PRENHES E SEUS
CONCEPTOS**

Simone Reschke Mendes Grance

Dra. Maria Araújo Teixeira

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal.

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
ABRIL DE 2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Coordenadoria de Biblioteca Central – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

G749e Grance, Simone Reschke Mendes.
Efeito do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* em ratas prenhes e seus conceptos / Simone Reschke Mendes Grance. -- Campo Grande, MS, 2007.
79 f. ; 30 cm.

Orientador: Maria Araújo Teixeira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1. Rato como animal de laboratório. 2. Rato – Feto. 3. Carqueja - Toxicologia. I. Teixeira, Maria Araújo. II. Título

CDD (22) – 636.089602733

SIMONE RESCHKE MENDES GRANCE

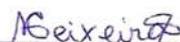
“Efeito do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* em ratas prenhes e seus conceptos”

“Effect of the hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* on pregnant rats and conceptus”

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde Animal

APROVADA: 14/02/2007



Dra. Maria Araújo Teixeira
Orientadora



Dra. Luciane Candeloro



Dra. Danielle Serra de Lima Moraes

Aos meus pais Geni e Henrique pelo amor, pelos esforços desmedidos para minha formação e pelo incansável apoio em cada nova empreitada de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus e seus mensageiros por me acompanharem e me sustentarem em todos os momentos da existência.

Aos meus queridos pais e esposo pela compreensão, paciência e apoio e ao amado filho pelo fiel companheirismo, até embaixo da água;

A minha orientadora, Maria Araújo Teixeira pela confiança em mim depositada e pela orientação que foi além destas páginas de papel. Pelo exemplo, pela coragem de dizer a verdade e pela humildade em reconhecer os erros cometidos.

A Rose, amiga e médica veterinária de alma e coração, pelo auxílio em todos os assuntos da vida e pelos profundos questionamentos sobre os mais diversos temas – animais. Obrigada pela amizade incondicional e pelo companheirismo, menos embaixo da água;

A Mariana Pereira Ribeiro pela valiosa ajuda e pela seriedade, responsabilidade e dedicação;

A Andréa Luiza Cunha-Laura e Andrea Lantieri Correa de Barros pela amizade e colaboração;

Aos pesquisadores Rodrigo Juliano de Oliveira e Véssia da Silva Leite pelo carinho e ajuda nas análises viscerais e esqueléticas;

A Dra. Maria do Carmo Vieira pela coleta da planta;

Ao Dr. João Máximo de Siqueira e a Elayne Cristina de Oliveira Tulli e Rafaela F. Grassi pela preparação do extrato hidroetanólico de *B. trimera*;

Aos bioquímicos João Batista Costa Neto e Wander Fernando de Oliveira Filiu pelo auxílio nas análises laboratoriais;

Aos professores Valter Joost van Onselen e Ruy Alberto Caetano Corrêa Filho pelo encaminhamento estatístico;

Aos professores Eurípedes Batista Guimarães, Andréia Regis de Assis e Simone Bertozi de S. Vasconcelos pelo auxílio nos estudos histológicos;

Ao professor Michael Robin Honer pelo entusiasmo e pela contagiante paixão pela pesquisa;

A Técnica Cirúrgica e a técnica da Técnica Cirúrgica pelos materiais cedidos gentilmente;

Aos funcionários do Biotério da UFMS, principalmente Maria e dona Dalci pela honestidade e boa vontade em colaborar;

A Marilete e Arlene pela boa vontade em atender nossos pedidos para ontem;

A CAPES pelo apoio financeiro.

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

Seja a mudança que queres ver no Mundo
(Mahatma Ghandi)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC em florescimento	16
ARTIGO 1	
Figura 1 - Ganho de peso corporal materno nos períodos gestacionais.....	36
Figura 2a - Fotomicrografia de corte histológico de rim de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez, evidenciando acúmulo de material granuloso amorfo eosinofílico no espaço de Bowman (seta). HE, 400x.....	39
Figura 2b - Fotomicrografia de corte histológico de rim de rata do grupo controle (água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez). HE, 400x	39
Figura 3a - Fotomicrografia de corte histológico de rim de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez, evidenciando tumefação do epitélio tubular (seta reta) e acúmulo de material granuloso amorfo eosinofílico discretamente refringente na luz tubular (seta dobrada). HE, 400x	39
Figura 3b - Fotomicrografia de corte histológico de rim de rata do grupo controle (água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez). HE, 400x	39
Figura 4a - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez, evidenciando tumefação celular e degeneração vacuolar dos hepatócitos, sendo mais afetados nas regiões periportais (seta). HE, 100x	40
Figura 4b - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rata do grupo controle (água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez). HE, 100x	40
Figura 5a - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez, evidenciando tumefação celular e degeneração vacuolar dos hepatócitos (seta). HE, 400x.....	40

Figura 5b - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rata do grupo controle (água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez). HE, 400x	40
ARTIGO 2	
Figura 1 - Ganho de peso corporal materno nos períodos gestacionais.....	53
Figura 2 - Fotografia de feto de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º dias de prenhez (tratamento 2) evidenciando placentomegalia, comparado ao feto de rata tratada com água destilada (controle)	54
Figura 3a - Secção de cabeça de feto de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º dias de prenhez evidenciando hidrocefalia moderada com dilatação de ventrículos laterais (a).....	55
Figura 3b - Secção de cabeça de feto de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º dias de prenhez evidenciando hidrocefalia severa com dilatação de ventrículos laterais (a) e terceiro ventrículo (b)	55
Figura 3c - Secção de cabeça de feto de rata tratada com água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez evidenciando ventrículos laterais (a) e terceiro ventrículo normais (b).....	56
Figura 4a - Base do crânio de feto de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez evidenciando ausência de ossificação em bulba timpânica (a) e redução de ossificação em pterigóide (seta) e basosfenóide (b).....	57
Figura 4b - Base do crânio de feto de rata tratada com água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez evidenciando ossificação normal em pterigóide (seta), basosfenóide (a) e bulba timpânica (b)	57
Figura 5a - Dorso do crânio de feto de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º dias de prenhez evidenciando redução de ossificação em parietal (a) e interparietal (b).....	57
Figura 5b - Dorso do crânio de feto de rata tratada com água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez evidenciando ossificação normal em parietal (a) e interparietal (b)	57
Figura 5c - Esternébrios de feto de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º dias de prenhez evidenciando redução de ossificação em 2º e 4º e ausência de ossificação em 5º e 6º	57

Figura 6a - Dorso do crânio de feto de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 6° ao 15° dias de prenhez evidenciando ossificação irregular em parietal (setas) e interparietal (a)	58
Figura 6b - Dorso do crânio de feto de rata tratada com água destilada do 1° ao 19° dias de prenhez evidenciando ossificação normal em parietal (a) e interparietal (b)	58
Figura 6c - Região caudal do crânio de feto de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 6° ao 15° dias de prenhez evidenciando ossificação irregular em supraoccipital (seta).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Plantas medicinais mais solicitadas aos raizeiros e/ou por eles indicadas. Campo Grande, 2002.....	15
ARTIGO 1	
Tabela 1 - Parâmetros hematológicos (média \pm desvio padrão) de ratas prenhes.....	37
Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos (média \pm desvio padrão) de ratas prenhes	37
Tabela 3 - Peso (média \pm desvio padrão) dos órgãos das ratas (g).....	38
Tabela 4 - Ocorrência (%) de alterações histopatológicas nos órgãos maternos de ratos	38
ARTIGO 2	
Tabela 1 - Peso (média \pm desvio padrão) dos órgãos das ratas (g).....	53
Tabela 2 - Parâmetros (média \pm desvio padrão) relativos à fertilidade e ao desenvolvimento fetal.....	55
Tabela 3 - Número de fetos analisados e ocorrência (%) de anormalidades viscerais na prole de ratas dos diferentes grupos experimentais	56
Tabela 4 - Número de fetos analisados e ocorrência (%) de anormalidades esqueléticas na prole de ratas dos diferentes grupos experimentais	59

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1 GÊNERO <i>Baccharis</i>	16
2 DIRETRIZES PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO <i>IN VIVO</i>	18
2.1 Estabelecimento da dose e via de administração da substância	19
2.2 Modelo experimental	19
2.3 Manejo dos animais em experimentos toxicológicos	19
2.4 Avaliação da toxicidade materna	20
2.5 Considerações sobre o desenvolvimento pré-natal	21
2.6 Avaliação da toxicidade para o desenvolvimento	22
REFERÊNCIAS	24
ARTIGO 1	29
1 Introdução	31
2 Material e métodos	32
2.1 <i>Material botânico e preparação do extrato</i>	32
2.2 <i>Animais</i>	32
2.3 <i>Protocolo experimental</i>	33
2.4 <i>Parâmetros hematológicos</i>	34
2.5 <i>Parâmetros bioquímicos</i>	35
2.6 <i>Análise morfológica macroscópica e microscópica</i>	35
2.7 <i>Análise estatística</i>	36
3 Resultados	36
4 Discussão	40
5 Referências	44
ARTIGO 2	47
1 Introdução	49
2 Material e métodos	50
2.1 <i>Coleta da planta e preparação do extrato</i>	50
2.2 <i>Animais</i>	50
2.3 <i>Protocolo experimental</i>	51
2.4 <i>Análise estatística</i>	52
3 Resultados	52
4 Discussão	59

5 Referências.....	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
ANEXO 1 - Manuscript Submission for Journal of Ethnopharmacology	67
ANEXO 2 - Manuscript Submission for Toxicology Letters	76

INTRODUÇÃO

As plantas fazem parte da vida do homem desde seus primórdios e sua importância nos diversos estágios de desenvolvimento da sociedade é inegável.

Até o início do século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e/ou extratos vegetais e esses recursos não diferiam muito dos remédios utilizados hoje em dia na medicina popular (SCHENKEL et al., 2002). Com o desenvolvimento da farmacologia, da química orgânica e da bioquímica, os medicamentos de origem sintética tomaram aos poucos o lugar das plantas medicinais. Apesar disso, nas últimas décadas, alguns fatores contribuíram para mudar essa postura, dentre eles: os efeitos indesejáveis e prejudiciais dos medicamentos sintéticos – observados tanto no uso correto como no uso abusivo, a preferência dos consumidores por terapias naturais e o difícil acesso da população aos medicamentos sintéticos (SIMÕES et al., 1998; CALIXTO, 2000).

No entanto, essa intensificação no uso de plantas para fins medicinais vem ocorrendo não apenas em países em desenvolvimento, mas também nos desenvolvidos. Prova disso é que, nos Estados Unidos, foi estimado que pelo menos um em cada três americanos utilizou plantas medicinais em 1998 (MAR & BENT, 1999).

No Brasil, cerca de 40% dos produtos farmacêuticos produzidos têm princípios ativos retirados de plantas e a utilização popular das plantas medicinais provém de diferentes origens e culturas tradicionais, principalmente de índios brasileiros, e da cultura e tradição africana e européia (SIMÕES et al., 1998).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), observando a franca expansão do uso de plantas medicinais e fitoterápicos nas últimas décadas em todo o mundo, vem estimulando o uso da medicina complementar/alternativa nos sistemas de saúde, de forma integrada às técnicas da medicina ocidental modernas. No documento “Estratégias da OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005”, a OMS preconiza o desenvolvimento de políticas observando os requisitos de segurança, eficácia, qualidade, uso racional e acesso a esses tratamentos (WHO, 2002).

Com base no trabalho da OMS, o Ministério da Saúde oficializa a política de práticas interativas e complementares no SUS, reconhecendo que a fitoterapia é um recurso terapêutico caracterizado pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas e que tal abordagem incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social (BRASIL, 2006).

Contudo, mesmo que a maior parte das espécies vegetais tenha potencial terapêutico, as plantas consideradas medicinais pela população ainda são aquelas testadas ao longo de muitos anos e que de alguma forma, científica ou empiricamente, tenham resultados comprovados (MARTINEZ et al., 2000).

No entanto, de acordo com a legislação atual, adotada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004), as espécies vegetais selecionadas para uso necessitam de comprovação científica de sua eficácia e segurança terapêutica, pois o uso de plantas medicinais, drogas vegetais e até de fitoterápicos pode estar relacionado com diferentes efeitos colaterais.

No estado de Mato Grosso do Sul, a aquisição de plantas medicinais de comunidades rurais, raizeiros e/ou curandeiros é uma prática comum. Muitas dessas plantas são encontradas em diversas formas para consumo. Entretanto, o uso indiscriminado de chás, garrafadas e/ou extratos, pode acarretar danos à saúde do usuário, uma vez que as comunidades urbanas e rurais utilizam-se das plantas sem possuírem o conhecimento sob o ponto de vista químico, farmacológico, toxicológico e, inclusive, de qualidade. Em um levantamento realizado em Campo Grande (MS) em duas épocas distintas: 1992 (SIQUEIRA et al., 1994) e 2002 (NUNES et al., 2003) junto aos raizeiros que operam no centro da cidade, foram detectadas informações referentes às plantas mais solicitadas pelos consumidores e/ou indicadas pelos raizeiros, bem como suas indicações terapêuticas. Na Tabela 1 pode-se observar as plantas mais solicitadas aos raizeiros de Campo Grande, segundo o levantamento realizado em 2002.

Tabela 1. Plantas medicinais mais solicitadas aos raizeiros e/ou por eles indicadas. Campo Grande, 2002.

Nome popular	Nome científico	Família	Atividade biológica (indicação popular)
Cancorosa	<i>Maytenus</i> cf. Macrodonta Reissek	Celastraceae	Depurativo do sangue, infecções cutâneas e renais, cicatrizante, antiinflamatório, úlceras, gastrite, câncer.
Carqueja	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC	Asteraceae	Dores no estômago, azia, má-digestão, gastrite, anemia, inflamação, dores no fígado, diabetes, emagrecedor, reumatismo.
Jatei-ka-há	<i>Archyrocline alata</i> (Kunth) DC	Asteraceae	Infecção no útero e próstata, hérnia, bronquite, apendicite, dores no estômago, labirintite,
Barbatimão	<i>Stryphnodendrom</i> <i>adstringens</i> (Mart.) Coville	Leguminosae Faboidae	Cicatrizante, feridas, para higiene pessoal, dores de garganta, coceiras.
Algodãozinho	<i>Cochlospermum</i> <i>regium</i> (Schrank) Pilg.	Cochlospermaceae	Infecções uterinas, infecções na próstata, feridas internas e externas, laxante, depurativo do sangue.

FONTE: NUNES et al., 2003.

No trabalho de Nunes et al. (2003), foi encontrada constância de espécies nos dois levantamentos realizados em períodos bastante distintos e a correlação positiva entre a automedicação e as plantas mais indicadas e/ou solicitadas, constatações estas que dão suporte ao pressuposto de que as plantas fazem parte do arsenal terapêutico da medicina popular.

Ainda neste estudo, observou-se que a automedicação é uma prática bastante difundida. Em nosso país, a extensão dessa prática não é conhecida com precisão, mas apenas por meio de levantamentos parciais e limitados. O uso indiscriminado de associações e o grande número de medicamentos (alopáticos, homeopáticos e fitoterápicos) disponíveis causam prejuízos consideráveis à saúde (AUTOMEDICAÇÃO, 2001).

No que se refere às plantas medicinais, o uso indiscriminado ocorre principalmente sob a justificativa de que o que é natural não faz mal, sendo utilizadas inclusive durante a gestação, fazendo com que gestantes e lactantes constituam um grupo populacional que culturalmente recorre ao uso de plantas medicinais (RIO DE JANEIRO, 2002). No entanto, o risco do uso indiscriminado destas plantas é elevado, uma vez que o efeito da maioria delas é desprovido de qualquer fundamentação científica (evidências) e a manipulação dessas plantas por leigos pode comprometer sua qualidade (AUTOMEDICAÇÃO, 2001).

1 GÊNERO *Baccharis*

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae, a qual concentra grande número de espécies com potencial terapêutico, algumas utilizadas na medicina popular e também na produção de fitoterápicos.

Baccharis trimera (Less.) DC ou *Baccharis genistelloides* var. *trimera* (Less.) Baker (Figura 1) é uma das espécies mais utilizadas no Brasil, sendo conhecida como carqueja ou carqueja amarga. É originária da América do Sul e cresce em campos e beira das estradas (SIMÕES et al., 1998).



Figura 1. *Baccharis trimera* (Less.) DC em florescimento.

Entre os habitantes do campo e das cidades, a infusão ou o decocto preparados com parte aérea da planta são utilizados como estomáquico, anti-reumático, anti-helmíntico, em problemas do fígado, enfermidades do baço, bexiga, inflamação das vias urinárias, e em casos de má circulação, diabetes, gastroenterite, anorexia e resfriado, bem como no tratamento tópico de feridas e ulcerações (SIMÕES et al., 1998; LORENZI, 1991).

Dentre os constituintes químicos de *Baccharis trimera* descritos estão lactonas diterpênicas, sesquiterpenos, flavonóides, saponina, taninos, polifenóis e óleo essencial: acetato de carquejol, nopineno, calameno, α e β cardineno, eledol, eudesmol, sendo que destes, o carquejol é considerado o principal constituinte ativo (SIMÕES et al., 1998; SOUSA et al., 1991).

Algumas de suas propriedades farmacológicas, bem como os princípios ativos envolvidos, já foram pesquisados. A atividade hepatoprotetora do extrato aquoso de *B. trimera* foi relatada por Soicke et al. (1987), sendo que dos cinco flavonóides isolados e testados contra intoxicação hepática experimental, a hispidulina demonstrou ser a mais eficaz.

Gamberini et al. (1991) utilizando o extrato aquoso de *B. trimera* em ratos e camundongos constataram uma redução do trânsito intestinal comprovando a indicação popular da planta como anti-diarréica e anti-espasmódica e, uma redução tanto na secreção ácida do estômago quanto no aparecimento de lesões gástricas, induzidas por estresse, comprovando a indicação popular da planta como antiácido e antidispéptico.

Os efeitos antiinflamatório e analgésico do extrato aquoso de *B. trimera* foram demonstrados por Gené et al. (1992), quando da administração intraperitoneal em ratos, sendo o flavonóide rutina e uma mistura de saponinas considerados 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).

A atividade antimutagênica *in vitro* da planta foi atribuída aos flavonóides luteolina, apigenina, cirsimaritina e hispidulina, com 90,9%, 85,2%, 81,0% e 77,2% de atividade antimutagênica, respectivamente (NAKASUGI & KOMAI, 1998), sendo necessário o ensaio *in vivo* para estudar os efeitos da absorção e metabolização do organismo sobre os flavonóides identificados, a fim de comprovar uma possível utilização da planta na prevenção do câncer.

Avancini et al. (2000) demonstraram a atividade antimicrobiana (bacteriostática e bactericida) do decocto de *B. trimera* em amostras de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas *in vitro*, possibilitando sua utilização como anti-séptico e desinfetante e mostrando a correlação entre os dados experimentais e o uso relatado popularmente.

Esta espécie já teve seus efeitos relaxantes da musculatura lisa vascular evidenciados por Torres et al. (2000), sendo que o fracionamento do extrato clorofórmico produziu o flavonóide eupatorina e um diterpeno, os quais foram identificados como ativos no 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.

Hnatyszyn et al. (2003) também identificaram o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso de cobaias, atribuindo o efeito aos compostos fenólicos e flavonóides obtidos dos extratos extraídos com metanol e diclorometano.

Os efeitos anti-artrítico e hipoglicemiante em camundongos foram descritos por Coelho et al. (2004) que obtiveram uma eficiência de 86% no tratamento contra artrite com o extrato aquoso de *B. trimera*, além de redução da glicose plasmática e dos níveis de colesterol.

Januário et al. (2004) identificaram um neoclerodano diterpenóide com ação inibidora sobre metaloproteases presentes no veneno de *Bothrops* (jararaca), demonstrando as propriedades anti-hemorrágica, antiproteolítica, antimiotóxica e antiedematogênica de *B. trimera*.

O sinergismo *in vitro* entre extrato de *B. trimera* e drogas antimicrobianas utilizadas contra 15 cepas de *Staphylococcus aureus* foi evidenciado por Betoni et al. (2006) que demonstraram a atividade antimicrobiana da planta e confirmaram o sinergismo da carqueja com tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, vancomicina e penicilina.

Embora vários trabalhos com *B. trimera* confirmem sua eficácia no que se refere à indicação popular, pouco se conhece sobre seus efeitos na gestação.

A Resolução nº. 1757, da Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro (RIO DE JANEIRO, 2002), contém uma listagem de drogas vegetais medicinais de uso contra-indicado durante o 1º trimestre de gestação e lactação, enquanto os estudos toxicológicos sobre sua utilização não estejam concluídos. Dentre as plantas relacionadas, a carqueja é contra-indicada para uso na gestação sob justificativa de ser relaxante da musculatura uterina, baseado no trabalho de Torres et al. (2000).

2 DIRETRIZES PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO *IN VIVO*

Os resultados obtidos de testes realizados *in vitro* não podem ser extrapolados para tecidos humanos, pois se devem levar em consideração as particularidades dos mecanismos de absorção, acumulação e eliminação de agentes químicos, e o grande número das possíveis interações entre as centenas ou milhares de compostos, os quais, *in vivo*, poderão levar a efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos, que não podem ser simuladas em teste *in vitro*.

A Agência de Proteção Ambiental (EPA) possui diretrizes para avaliar a toxicidade potencial para o desenvolvimento pré-natal associado à exposição humana aos agentes externos. Com base em estudos experimentais em animais, muitos agentes externos são

considerados causadores de toxicidade, enquanto outros são suspeitos de causar toxicidade para o desenvolvimento humano (U.S. EPA, 1991).

2.1 Estabelecimento da dose e via de administração da substância

Estudos com animais de laboratório são utilizados para identificar a relação entre a dose e a exposição a uma substância e os efeitos adversos associados. Para identificar o risco, ou seja, a probabilidade de ocorrer efeito adverso associado à exposição a agentes químicos deve-se estabelecer a dose com base em informações obtidas sobre as doses que a população humana está comumente exposta (MANSON & KANG, 1989).

A administração da substância teste deve ser aproximadamente no mesmo horário e, de acordo com a recomendação da literatura especializada, a via de administração deve ser a mesma utilizada pela população humana (MANSON & KANG, 1989).

2.2 Modelo experimental

O rato é o segundo mamífero mais frequentemente utilizado na pesquisa biomédica, sendo considerada a espécie padrão para estudos toxicológicos, teratológicos e carcinogênicos. Características como período gestacional reduzido, docilidade e pronta disponibilidade de animais com padrão sanitário e antecedentes genéticos bem definidos são responsáveis pela importância do rato como animal de experimentação (KOHN & CLIFFORD, 2002).

2.3 Manejo dos animais em experimentos toxicológicos

Os animais devem ser tratados, mantidos e alojados de acordo com as recomendações do “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

Para minimizar a influência de fatores ambientais, os animais devem ser aclimatados durante dez dias antes do início dos acasalamentos (MANSON & KANG, 1989).

As fêmeas devem ser nulíparas e o acasalamento deve ser realizado colocando-se até três fêmeas na caixa de um macho, sendo realizada a confirmação da prenhez pela observação de espermatozóides no esfregaço vaginal (MANSON & KANG, 1989).

2.4 Avaliação da toxicidade materna

Alguns fatores servem como possíveis indicadores de toxicidade materna incluindo mortalidade, peso corporal, ganho de peso corporal, peso dos órgãos, consumo de água e alimentos, sinais clínicos de toxicidade, lesões macroscópicas e microscópicas, além do ganho de peso médio corrigido, sendo este obtido pela diferença entre peso corporal materno inicial e final menos o peso do útero grávido (U.S. EPA, 1998).

Durante o estudo, cada animal deve ser observado duas vezes ao dia. Primeiramente, realiza-se a observação comportamental com o animal dentro de sua caixa, seguida de exame clínico que deve ser feito no momento de registro dos pesos corporais (U.S. EPA, 1998).

Além do exame clínico, em estudos toxicológicos é comum avaliar a concentração de numerosas substâncias orgânicas e inorgânicas, que são selecionadas com base na medicina clínica humana (LOEB, 1997). Além da avaliação dos elementos figurados do sangue, a análise da alanina aminotransferase (ALT) e sorbitol desidrogenase são importantes para avaliar a função hepática, enquanto uréia e creatinina são importantes para avaliar a função renal (THOMPSON, 1992), sendo também relevante incluir análise de proteína total, albumina, glicose, triglicerídios e colesterol (WEINGAND et al., 1992).

A análise histológica também é uma importante ferramenta nos estudos toxicológicos, uma vez que alterações na estrutura e organização das células, tecidos e órgãos permite a identificação da lesão tissular e orgânica, essencial na definição dos padrões morfológicos e clínicos da doença.

A interação entre o estudo histológico e a avaliação bioquímica é particularmente uma vantagem para o toxicologista, sendo mais efetiva na identificação da intoxicação. Essa interação é evidenciada por Travlos et al. (1996) que relatam existir associação entre histopatologia hepática e alterações séricas de alanina aminotransferase (ALT) e entre histopatologia renal e alterações séricas de uréia e creatinina.

2.5 Considerações sobre o desenvolvimento pré-natal

A gestação do rato dura aproximadamente 21 a 23 dias, sendo dividido em três períodos (GUIMARÃES & MÁZARO, 2004):

- Pré-implantação ou “tudo ou nada” – abrange do 1º ao 5º dias de gestação, período caracterizado pela formação do blastocisto e início da implantação. As características deste período se aproximam do período da fertilização até a segunda semana de desenvolvimento embrionário na gestação humana, conforme Moore & Persaud (2004);

- Organogênico – do 6º ao 15º dias de gestação, término da implantação e período de formação dos tecidos e órgãos. As características deste período se aproximam do período de terceira a oitava semanas de desenvolvimento embrionário na gestação humana (MOORE & PERSAUD, 2004);

- Fetal – do 16º ao 21º dias de gestação, período no qual o feto já com os órgãos formados inicia seu crescimento intra-uterino, com maturação funcional dos órgãos. As características deste período se aproximam do período de nona semana de desenvolvimento até o nascimento (MOORE & PERSAUD, 2004).

O conhecimento desses períodos é fundamental para as pesquisas na área de toxicologia da reprodução. O período mais crítico do desenvolvimento é o período da organogênese, quando tecidos e órgãos estão se diferenciando rapidamente, ficando susceptíveis a interferência de agentes externos (teratógenos) capazes de alterar seu desenvolvimento aumentando a incidência de anomalias congênitas (MOORE & PERSAUD, 2004).

O parto, normalmente, ocorre no 21º e 22º dias de gestação. Sendo assim, para realização do estudo da ninhada, é necessário que a gestação seja interrompida no 20º dia, uma vez que recém-nascidos malformados ou com baixa viabilidade são frequentemente canibalizados pelas genitoras.

2.6 Avaliação da toxicidade para o desenvolvimento

Os efeitos adversos para o desenvolvimento podem resultar da exposição a um agente tóxico antes da concepção, durante o desenvolvimento prenatal ou no período de maturação sexual (U.S. EPA, 1996).

Para a realização da cesariana em ratos é recomendado o uso de éter etílico ou CO₂ (TAYLOR, 1986), sendo contra-indicada a utilização de barbitúricos, pois estes atravessam rapidamente a placenta e causam depressão respiratória nos fetos, dificultando a averiguação e contagem dos fetos vivos (ADRIANI, 1970).

Depois de retirados do útero, os fetos devem ser inspecionados sistematicamente, para se certificar de que estejam vivos ou mortos e para a verificação de possíveis anomalias estruturais externas.

Após a classificação das anormalidades estruturais externas a prole deve ser examinada para verificação de anomalias viscerais e esqueléticas. Para análise visceral devem ser feitos cortes/microdissecção propostos por Barrow & Taylor (1969) e Wilson (1965). Para a análise esquelética os fetos devem ser preparados pelo método de diafanização e coloração por Alizarina red, conforme Staples & Schnell (1964).

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).

Malformação congênita é o termo utilizado para descrever perturbação do desenvolvimento presente ao nascimento que, em humanos, é a principal causa de mortalidade neonatal, sendo a quinta maior causa de perda potencial de vidas antes dos 65 anos (SADLER, 2005). Em 40 a 60% das pessoas com malformações congênicas a causa não é conhecida. Fatores genéticos são responsáveis por cerca de 20% dos casos; fatores ambientais produzem aproximadamente 10%, enquanto uma combinação de influências genéticas e ambientais (herança multifatorial) causa 20 a 25% dos defeitos (SADLER, 2005).

Ao se pesquisar a possibilidade de uma droga ou um composto químico causar uma malformação (efeito teratogênico), três princípios importantes devem ser considerados:

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; dosagem da droga ou composto químico – pesquisas em animais mostraram uma relação dose-resposta para os teratógenos, indicando que quanto maior a exposição durante a gestação, mais grave é o efeito fenotípico; e genótipo do embrião – numerosos exemplos em animais experimentais e vários casos suspeitos em seres humanos demonstram existir diferenças genéticas na resposta a um teratógeno, indicando que o genótipo do embrião determina se um agente teratogênico perturbará seu desenvolvimento (MOORE & PERSAUD, 2004).

Embora os embriões humanos estejam bem protegidos no útero, agentes externos podem causar perturbações no desenvolvimento após a exposição materna a eles.

Diante do exposto, conclui-se que o uso indiscriminado de plantas medicinais é uma realidade em todo o mundo. Por isso, é necessário que mais pesquisas sejam realizadas no intuito de avaliar os efeitos das plantas nos sistemas biológicos, a fim de esclarecer à população em geral e aos profissionais da saúde sobre os riscos do uso indiscriminado de espécies vegetais.

Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, a carqueja é a segunda planta mais consumida pela população local, inclusive na gestação, e poucas são as informações disponíveis sobre a possibilidade de efeito tóxico para as gestantes e fetos.

Assim, este trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos da ingestão oral do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* por ratas prenhes e investigar a ocorrência de alterações externas, viscerais, esqueléticas e histológicas nos fetos das ratas expostas ao extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* do 1º ao 19º dias de prenhes e do 6º ao 15º dias de prenhes.

REFERÊNCIAS

ADRIANI, J. The Pharmacology of Anesthetic Drugs. Illinois: Charles C. Thomas, 1970, 313p.

AUTOMEDICAÇÃO. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 4, 2001. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302001000400001&lng=en&nrm=iso. Access on: 08 Nov 2006.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Bacteriostatic and bactericidal activity of the *Baccharis trimera* (Less.) D.C. - Compositae decocto, as disinfectant or antiseptic. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 3, 2000. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352000000300011&lng=en&nrm=iso. Access on: 06 Nov 2006.

BARROW, M. V.; TAYLOR, W. I. A rapid method for detecting malformation in rat fetuses. **Journal of Morphology**, v. 127, p. 291-306, 1969.

BETONI, J. E. C. et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006.

BRASIL. Portaria nº. 971, de 03 de maio de 2006. Oficializa a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 04 de maio de 2006. Disponível em: <http://www.interessepublico.com.br/content/legislacao.asp?id=25080>. Acesso em: 08 Nov 2006.

BRASIL. Resolução-RDC nº. 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Registro de Medicamentos Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 18 de março de 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>. Acesso em: 08 Nov 2006.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CHAHOUD, I. et al. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 1, p. 77-82, 1999.

COELHO, M. G. P. et al. Anti-arthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. **Toxicology Letters**, v. 154, p. 69-80, 2004.

- GAMBERINI, M. T. et al. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, suppl. II, p. 137-139, 1991.
- GENÉ, R. M.; MARÍN, E.; ADZET, T. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. **Planta Medica**, v. 58, p. 565-566, 1992.
- GENÉ, R. M. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta Medica**, v. 62, p. 232-235, 1996.
- GUIMARÃES, M. A.; MÁZARO, R. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP, p. 80-119, 2004.
- HNATYSZYN, O. et al. Argentinian plant extract with relaxant effect on the smooth muscle of the *corpus cavernosum* of Guinea pig. **Phytomedicine**, v. 10, p. 669-674, 2003.
- JANUÁRIO, A. H. et al. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, p. 243-251, 2004.
- KOHN, D. F.; CLIFFORD, C. B. Biology and diseases of rats. In: J.G. Fox (Eds.) **Laboratory Animal Medicine**. San Diego: Academic Press, pp. 121-165, 2002.
- LOEB, W. F. Clinical biochemistry of laboratory rodents and rabbits. In: J.J. Kaneko, J.W. Harvey, M.L. Bruss (Eds.) **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, pp. 845-855, 1997.
- LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Plantarum: Nova Odessa, 1991. 440p.
- MANSON, J. M.; KANG, Y. J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: A.W. Hayes (Eds.) **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, p. 311-359, 1989.
- MAR, C.; BENT, S. An evidence-based review of the 10 most commonly used herbs. **Western Journal of Medicine**, v.171, p.168-171, 1999.
- MARTINEZ, J. V.; BERNAL, H. Y.; CÁCERES, A. (Editores). **Fundamentos de agrotécologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericana**. Bogotá: CYTED, 2000, 524p.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, 609p.
- NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2560-2564, 1998.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington: National Academy Press, 1996, 140p.

NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 83-92, 2003.

RIO DE JANEIRO. Resolução – SES/RJ nº. 1757, de 18 de fevereiro de 2002. Contra-indica o uso de plantas medicinais no Estado do Rio de Janeiro. **Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro**, de 20 de fevereiro de 2002. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/proplam/RES1757.doc>. Acesso em: 08 Nov 2006.

SADLER, T. W. **Langman Embriologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 347p.

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/UFSC, p. 301-330, 2002.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1998, 173p.

SIQUEIRA, J. M. et al. Plantas medicinais comercializadas pelos raizeiros em Campo Grande-MS. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13, 1994, Fortaleza. **Anais...** Ceará, 1994.

SOICKE, H., LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v. 53, p. 37-39, 1987.

STAPLES, R. E., SCHNELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. **Stain Technology**, v. 39, p. 61-63, 1964.

SOUSA, M. P. et al. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: UFC, p. 223-228, 1991.

TAYLOR, P. **Practical Teratology**. New York: Academic Press, 1986, 171p.

TESKE, M., TRENTINI, A. M. M. Herbarium Compêndio de Fitoterapia. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997, 317p.

THOMPSON, M. B. Clinical pathology in the National Toxicology Program. **Toxicologic Pathology**, v. 20, p. 484-489, 1992.

TORRES, L. M. et al. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, p. 617-619, 2000.

TRAVLOS, G. S. et al. Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology. **Toxicology**, v. 107, p. 17-29, 1996.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1991. Guidelines for developmental toxicity risk assessment. **Federal Register** 56(234):63798-63826. Available from: <http://www.epa.gov/ncea/raf/pdfs/devtox.pdf>. Access on: 30 Nov 2006.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1996. Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. **Federal Register** 61(212):56274-56322. Available from: <http://www.epa.gov/nceawww1/raf/pdfs/repro51.pdf>. Access on: 30 Nov 2006.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1998.. Prenatal developmental toxicity study. **Health effects test Guidelines**. OPPTS 870.3700. Available from: http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/series/870-3700.pdf. Access on: 30 Nov 2006.

WEINGAND, K. et al. Clinical pathology recommendation for nonclinical toxicity and safety studies. **Toxicologic Pathology**, v. 20, p. 539-543, 1992.

WHO. **Traditional Medicine Strategy 2002-2005**. Geneva, 2002. Available from: <http://www.who.int/medicines/publications/traditionalpolicy/en/index.html>. Access on: 06 Nov 2006.

WILSON, J. G. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: J. G. Wilson, J. Warkany eds. **Teratology: principles and techniques**. Chicago: University of Chicago Press, p. 262-277, 1965.

***Baccharis trimera*: efeito sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação hepatorrenal em ratas prenhes**

Simone Reschke Mendes Grance^{a1}, Maria Araújo Teixeira^b, Roseana Silveira Leite^b, Eurípedes Batista Guimarães^c, João Máximo de Siqueira^d, Wander Fernando de Oliveira Filii^d, Simone Bertozi de Souza Vasconcelos^e, Maria do Carmo Vieira^f.

^a Mestranda do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cx Postal 549, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^b Biotério Central, UFMS, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^c Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Cx Postal 549, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^d Departamento de Farmácia e Bioquímica, UFMS, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^e Departamento de Morfofisiologia, UFMS, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^f Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil

Resumo

O trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* na gestação de ratos Wistar. Foram avaliadas 35 ratas prenhes distribuídas em três grupos: os tratamentos 1 e 2 receberam 8,4mg/kg do extrato, por via oral, do 1º ao 19º e do 6º ao 15º dias de prenhez (DP), respectivamente, enquanto o grupo controle recebeu água destilada do 1º ao 19º DP, também por via oral. As ratas foram pesadas nos dias 1, 6, 15 e 20 de gestação. No 20º DP os animais foram anestesiados e submetidos à colheita de sangue, laparotomia, pesagem e avaliação histológica de fígado, rins e baço maternos. Não houve indicativo de toxicidade materna observável por critérios clínicos nem alteração no ganho de peso corrigido e nos parâmetros hematológicos. Houve diferenças significativas nos níveis séricos de uréia e peso dos rins entre o tratamento 1 e o controle. Houve alterações histopatológicas significativas nos rins e fígado das ratas de ambos os tratamentos. Os resultados revelam que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* administrado a ratas prenhes na concentração de 8,4mg/kg é tóxico para células renais e hepáticas maternas, embora as alterações observadas sejam reversíveis uma vez suspensa a utilização do extrato.

Palavras-chave: Extrato Hidroetanólico, Asteraceae, *Rattus norvegicus*, Toxicidade.

¹ Correspondência para o autor: Tel. +55 67 99585282; fax: +55 67 33183000
E-mail: simonermg@yahoo.com.br

***Baccharis trimera*: effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats**

Simone Reschke Mendes Grance^{a2}, Maria Araújo Teixeira^b, Roseana Silveira Leite^b, Eurípedes Batista Guimarães^c, João Máximo de Siqueira^d, Wander Fernando de Oliveira Filii^d, Simone Bertozi de Souza Vasconcelos^e, Maria do Carmo Vieira^f.

^a Mestranda do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cx Postal 549, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^b Biotério Central, UFMS, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^c Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Cx Postal 549, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^d Departamento de Farmácia e Bioquímica, UFMS, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^e Departamento de Morfofisiologia, UFMS, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^f Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil

Abstract

The aim of this investigation was to evaluate the effect of the hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* on pregnant Wistar rats. The 35 female rats evaluated and distributed into three groups. Those in treatment groups 1 and 2 were given 8.4 mg/kg of the extract orally from gestational day (GD) 1 to 19 and from GD 6 to 15, respectively, whereas those in control group received distilled water orally from GD 1 to 19. Body weights were recorded on GD 1, 6, 15, and 20. On GD 20 all animals were anesthetized, blood samples were collected and maternal liver, kidneys and spleen were weighed and processed for histological studies. No clinical signs of maternal toxicity were observed. No changes in corrected body weight or in hematological parameters were found. Urea levels and kidneys weight differed significantly between treatment 1 animals and controls. No histopathological alterations were found in kidneys or liver in both treatment groups. The results revealed that the hydroethanolic extract of *B. trimera* administered to pregnant rats at a concentration of 8.4 mg/kg is toxic to maternal kidney and liver cells, although the alterations are reversible once administration is discontinued.

Keywords: Hydroethanolic Extract, Asteraceae, *Rattus norvegicus*, Toxicity.

² Corresponding author: Tel. +55 67 99585282; fax: +55 67 33183000
E-mail: simonermg@yahoo.com.br

1. Introdução

A utilização de plantas medicinais é uma prática generalizada na medicina popular, à qual a população tem recorrido como alternativa para tratamento e prevenção de doenças, em virtude dos efeitos colaterais e dos altos preços dos medicamentos convencionais. *Baccharis trimera* (Less) DC, conhecida popularmente como carqueja, é originária da América do Sul e algumas propriedades farmacológicas já foram pesquisadas, tais como as aplicadas ao tratamento de enfermidades do fígado e do trato gastrointestinal (Soicke et al., 1987; Gamberini et al., 1991), de processos inflamatórios (Gené et al., 1996) e de diabetes (Oliveira et al., 2005). Além disso, em decorrência dos seus princípios amargos, purifica e elimina as toxinas do sangue pela ação diurética que exerce (Almeida, 1993). Contudo, apesar de vários trabalhos com *B. trimera* confirmarem sua eficácia no que se refere à indicação popular, sabe-se pouco sobre os efeitos da planta para gestantes.

Para avaliar a ocorrência de efeitos tóxicos de substâncias químicas na gestação deve-se considerar que neste período ocorrem alterações fisiológicas que favorecem o aumento na absorção de drogas, como aumento na função renal, decréscimo no metabolismo hepático e redução nos níveis de albumina plasmática, o que aumenta a proporção de drogas livres no plasma da gestante (Hyttén, 1984).

Por isso, diante do aumento da susceptibilidade a intoxicações observado na prenhez, além da avaliação clínica comumente utilizada em estudos toxicológicos, é necessária uma avaliação completa do estado de saúde da gestante, incluindo avaliação hematológica, bioquímica e histológica, como é realizado rotineiramente em estudos toxicológicos com adultos (Manson e Kang, 1989).

Além disso, de acordo com o protocolo experimental para estudos toxicológicos (U.S. EPA, 1991), para estimar o risco e obter informações sobre a segurança na utilização de um

composto, a dose e a via de administração da substância testada devem ser as mesmas às quais a população humana está exposta.

Assim, a presente investigação objetivou avaliar o efeito do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação hepatorenal na gestação de ratas expostas ao tratamento no período da organogênese e durante toda gestação.

2. Material e métodos

2.1. Material botânico e preparação do extrato

A parte aérea de *Baccharis trimera* foi coletada no Horto de Plantas Medicinais (HPM) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados – MS, pela Dra. Maria do Carmo Vieira. A exsicata de número 905 está depositada no Herbário DDMS, em Dourados – MS. O material botânico foi seco em estufa de circulação de ar forçada, à temperatura de 36 a 38°C. No Laboratório de Farmacognosia da UFMS, em Campo Grande, o material vegetal foi intumescido em solvente etanol 70° GL e macerado, foi feita percolação e eliminação do solvente em rota-evaporador, seguido de secagem em dessecador. A massa resultante foi dividida em alíquotas de 8,4mg/kg e diluídas em 0,3mL de água destilada, sendo as alíquotas estocadas e conservadas a -5°C até sua utilização.

2.2. Animais

Foram utilizadas 35 ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar nulíparas, heterogênicas, de padrão sanitário convencional, com idade média de quatro meses e peso médio de 250g. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS),

alojados em gaiolas plásticas (490x340x160mm), de acordo com as recomendações internacionais de densidade populacional (National Research Council, 1996) e mantidos no Biotério de Experimentação da UFMS, com temperatura ambiente aproximadamente constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa de 55-75% e fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro. Os ratos receberam ração granulada para ratos (Nuvilab-CR1, Nuvital Ltda, Curitiba, PR, Brasil) e água à vontade. O protocolo nº 112/2006 para uso de animais em experimentação foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS e também está de acordo com National Research Council (1996).

2.3. *Protocolo experimental*

As ratas foram acasaladas por seis horas, com machos de fertilidade previamente comprovada, considerando-se prenhe a rata cujo esfregaço vaginal continha espermatozoides após o período de acasalamento, designando-se este dia como o dia da fertilização (dia zero da gestação). Após a detecção da prenhez, as ratas foram distribuídas aleatoriamente nos três grupos experimentais.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os 35 animais foram distribuídos em três grupos de tratamentos: grupo 1 com 12 ratas – *Baccharis trimera* do 1º ao 19º dias de prenhez (DP), grupo 2 com 11 ratas – *Baccharis trimera* do 6º ao 15º DP e grupo 3 com 12 ratas – água destilada do 1º ao 19º DP.

Tratamento 1: as ratas receberam 0,3mL/dia do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (EHBT) na concentração de 8,4mg/kg, por via oral, do 1º ao 19º DP.

Tratamento 2: as ratas receberam 0,3mL/dia, do EHBT na concentração de 8,4mg/kg, por via oral, 6º ao 15º DP.

Controle: as ratas receberam 0,3mL/dia de água destilada nos mesmos dias do tratamento 1, também por via oral.

Neste período, os animais foram inspecionados duas vezes ao dia para observação de indicativos clínicos de toxicidade: alterações de atividade locomotora, piloereção, ocorrência de diarreia e morte (Manson e Kang, 1989).

As ratas, de ambos os tratamentos, foram pesadas nos dias 1, 6, 15 e 20 de gestação. No 20º DP, os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico e foi realizada a laparotomia exploratória. Em seguida, para coletar o sangue, as alças intestinais foram afastadas permitindo o acesso à artéria aorta abdominal. O sangue foi coletado a vácuo e acondicionado em dois tubos com capacidade para 2mL cada: um com anticoagulante, destinado à determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro sem anticoagulante, para obtenção do soro para determinação dos parâmetros bioquímicos.

2.4. Parâmetros hematológicos

Os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados em analisador automático de células hematológicas Coulter T890, no Laboratório Multilab. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas coradas com May-Grünwald-Giemsa, sendo que em cada extensão foram analisadas e contadas 100 células.

2.5. *Parâmetros bioquímicos*

Para análise bioquímica, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos e, em seguida, foram determinadas as dosagens bioquímicas de glicose, uréia, creatinina, proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário (UFMS) utilizando-se analisador automático Dade Behring Dimension, com kits comerciais Dade Behring®.

2.6. *Análise morfológica macroscópica e microscópica*

Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por exsanguinação e o útero foi pesado com os conceptos e, após a remoção destes, sem os conceptos, para o cálculo do ganho de peso corrigido (ganho de peso materno do 1º ao 20º dias de prenhez menos o peso dos conceptos). Posteriormente, rins, fígado e baço maternos foram removidos, dissecados, e inspecionados quanto à forma, coloração e consistência, sendo então pesados em balança analítica de precisão Marte, modelo AL 500C, com sensibilidade de 0,01g.

Para análise histológica foram retirados fragmentos representativos dos órgãos, os quais foram fixados em solução de Bouin. Após a fixação, os fragmentos de tecidos selecionados foram desidratados, diafanizados e emblocados em parafina. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 6µm de espessura, que foram corados com hematoxilina e eosina, para observação de possíveis lesões por meio de microscopia óptica.

2.7. Análise estatística

Para análise dos dados com distribuição normal foi utilizada Análise de Variância, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, quando encontradas diferenças significativas. Os demais dados foram analisados pelo Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn, no caso de diferenças significativas. As proporções foram analisadas pelo Teste de Qui-Quadrado. O nível de significância admitido foi de $\alpha = 0,05$.

3. Resultados

Durante o período de tratamento, nenhuma morte foi registrada. Não foram observadas alterações na atividade locomotora dos animais, nem ocorrência de piloereção e diarreia.

Os pesos corporais maternos no tratamento 1, no período do 15º ao 20º dias de prenhez, diferiram do grupo controle (Figura 1).

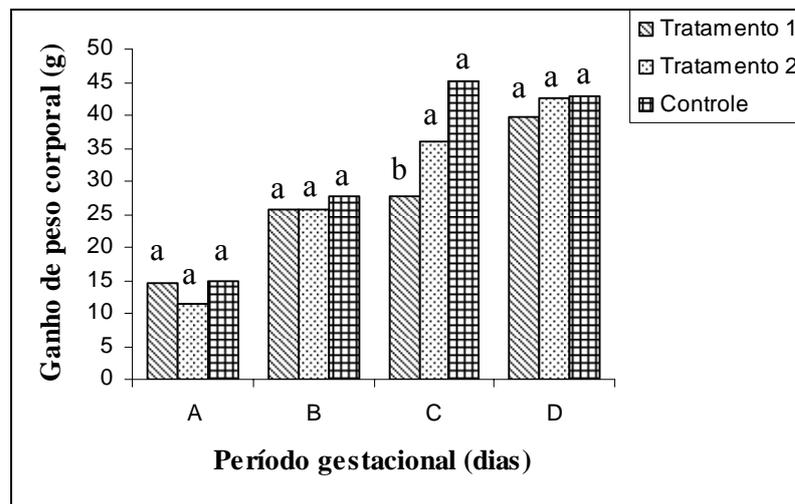


Figura 1. Ganho de peso corporal materno nos períodos gestacionais (dias de prenhez): A – 1º ao 6º, B – 6º ao 15º, C – 15º ao 20º e D – 1º ao 20º (ganho de peso materno sem o peso dos conceitos).

Tratamento 1: 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez;

Tratamento 2: 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º dias de prenhez;

Controle: água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez.

a,b no mesmo período gestacional indicam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$)

Os resultados obtidos a partir na avaliação hematológica foram semelhantes entre os dois grupos tratados com extrato hidroetanólico de carqueja e o grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros hematológicos (média ± desvio padrão) de ratas prenhes.

Parâmetros hematológicos	Tratamento 1 (n=12)	Tratamento 2 (n=11)	Controle (n=12)
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	6,39 ± 0,35	6,59 ± 0,57	6,25 ± 0,52
Hemoglobina (g/dl)	12,02 ± 0,63	12,34 ± 0,79	11,62 ± 0,71
Hematócrito (%)	35,26 ± 2,05	36,85 ± 2,82	34,37 ± 2,53
VCM (fl)	55,19 ± 0,82	55,86 ± 0,96	54,82 ± 1,20
HCM (pg)	18,83 ± 0,20	18,76 ± 0,54	18,63 ± 0,60
CHCM (g/dl)	34,11 ± 0,64	33,53 ± 0,95	34,11 ± 0,85
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	1094,80 ± 61,72	1141,44 ± 155,07	1160,91 ± 70,23
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,59 ± 1,58	6,75 ± 2,40	6,70 ± 1,22
Neutrófilos (%)	75,25 ± 2,86	75,27 ± 3,23	74,38 ± 2,57
Linfócitos (%)	22,42 ± 2,94	22,73 ± 3,64	23,08 ± 3,12
Monócitos (%)	2,08 ± 1,17	1,91 ± 0,94	2,38 ± 1,50
Eosinófilos (%)	0,17 ± 0,39	0,09 ± 0,30	0,08 ± 0,28
Basófilos (%)	0,08 ± 0,29	0 ± 0,00	0,08 ± 0,28

Tratamento 1 – 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez (DP), tratamento 2 – 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º DP e controle – água destilada do 1º ao 19º DP.

VCM = volume corpuscular médio, HCM = hemoglobina corpuscular média e CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

Teste Kruskal-Wallis ($p > 0,05$)

Os resultados obtidos na avaliação bioquímica não diferiram entre os tratamentos, exceto para o valor da uréia que aumentou significativamente no grupo submetido ao tratamento com EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez – tratamento 1 (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos (média ± desvio padrão) de ratas prenhes.

Parâmetros Bioquímicos	Tratamento 1 (n=12)	Tratamento 2 (n=11)	Controle (n=12)
Glicose (mg/dL)	180,75 ± 29,01 ^a	169,33 ± 53,37 ^a	158,64 ± 17,26 ^a
Uréia (mg/dL)	91,17 ± 14,89 ^b	80,64 ± 16,28 ^a	70,73 ± 5,35 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,79 ± 0,13 ^a	0,75 ± 0,12 ^a	0,71 ± 0,09 ^a
Proteínas totais (g/dL)	5,94 ± 0,84 ^a	6,57 ± 0,74 ^a	6,19 ± 0,65 ^a
Albumina (g/dL)	3,29 ± 0,46 ^a	3,36 ± 0,36 ^a	3,20 ± 0,40 ^a
ALT (U/L)	58,58 ± 53,43 ^a	52,55 ± 12,93 ^a	51,18 ± 13,78 ^a
AST (U/L)	88,33 ± 51,45 ^a	75,20 ± 32,42 ^a	63,50 ± 22,50 ^a

Tratamento 1 – 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez (DP), tratamento 2 – 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º DP e controle – água destilada do 1º ao 19º DP.

ALT = alanina aminotransferase e AST = aspartato aminotransferase

Legenda: letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa (Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,01$)

Não foram encontradas diferenças no que se refere à análise macroscópica de rins, fígado e baço. Apenas o peso dos rins dos animais do tratamento 1 diferiu estatisticamente do controle (Tabela 3).

Tabela 3. Peso (média ± desvio padrão) dos órgãos das ratas (g).

	Tratamento 1 (n=12)	Tratamento 2 (n=11)	Controle (n=12)
Peso do rim direito	0,82 ± 0,08 ^b	0,76 ± 0,09 ^a	0,73 ± 0,05 ^a
Peso do rim esquerdo	0,76 ± 0,08 ^b	0,74 ± 0,08 ^a	0,72 ± 0,06 ^a
Peso do fígado	13,43 ± 1,86 ^a	12,32 ± 1,37 ^a	12,92 ± 1,42 ^a
Peso do baço	0,69 ± 0,09 ^a	0,69 ± 0,09 ^a	0,64 ± 0,06 ^a

Tratamento 1 – 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez (DP), tratamento 2 – 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º DP e controle – água destilada do 1º ao 19º DP.

Legenda: letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey, p<0,05)

Em relação à análise microscópica dos órgãos maternos, ocorreram alterações histopatológicas renais e hepáticas que diferiram significativamente nos animais dos tratamentos 1 e 2, comparados ao controle (Tabela 4). Não foram observadas alterações histopatológicas no baço dos animais dos grupos tratados e do grupo controle.

Tabela 4. Ocorrência (%) de alterações histopatológicas nos órgãos maternos de ratos.

	Tratamento 1 (n=12)	Tratamento 2 (n=11)	Controle (n=12)
Rim direito	91,7*	81,8*	25,0
Rim esquerdo	91,7*	81,8*	25,0
Fígado	58,3*	63,6*	16,7

Tratamento 1 – 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez (DP), tratamento 2 – 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º DP e controle – água destilada do 1º ao 19º DP.

* p< 0,05 comparado ao controle. (Teste Qui-Quadrado)

O exame histopatológico do rim revelou a presença de material granuloso amorfo eosinofílico no espaço da cápsula de Bowman e hiperemia dos capilares glomerulares (Figura 2a, com respectivo controle 2b). As células do epitélio tubular evidenciaram tumefação e desaparecimento da borda em escova. Os túbulos proximais mais intensamente afetados apresentaram luz com depósito de material granuloso amorfo eosinofílico, discretamente refringente (Figura 3a, com respectivo controle 3b).

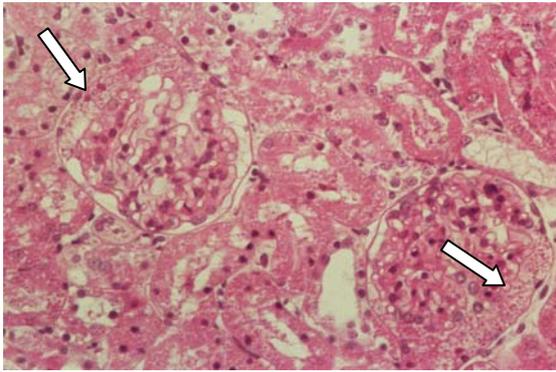


Figura 2a. Fotomicrografia de corte histológico de rim de rata tratada com 8,4mg/kg de EGBT do 1º ao 19º dias de prenhez, evidenciando acúmulo de material granuloso amorfo eosinofílico no espaço de Bowman (seta). HE, 400x.

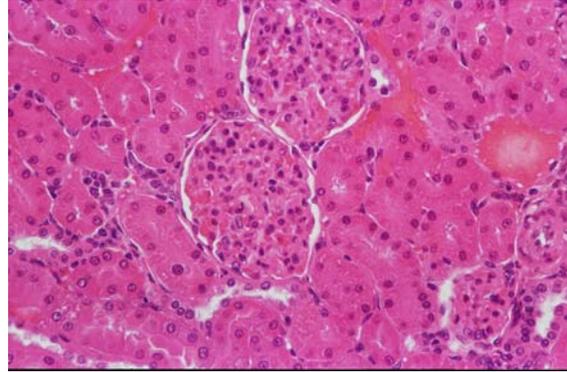


Figura 2b. Fotomicrografia de corte histológico de rim de rata do grupo controle (água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez). HE, 400x.



Figura 3a. Fotomicrografia de corte histológico de rim de rata tratada com 8,4mg/kg de EGBT do 1º ao 19º dias de prenhez, evidenciando tumefação do epitélio tubular (seta reta) e acúmulo de material granuloso amorfo eosinofílico discretamente refringente na luz tubular (seta dobrada). HE, 400x.

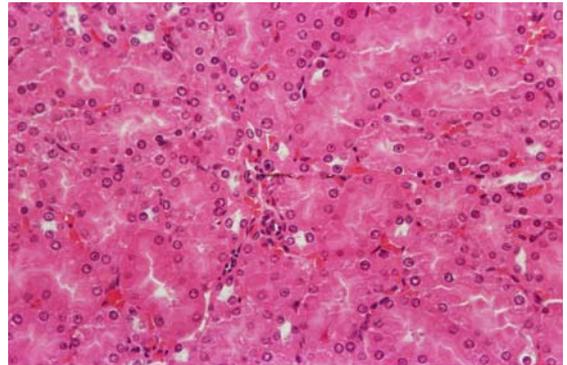


Figura 3b. Fotomicrografia de corte histológico de rim de rata do grupo controle (água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez). HE, 400x.

A histopatologia do fígado revelou tumefação celular difusa tendendo para degeneração vacuolar (Figuras 4a e 5a, com os respectivos controles 4b e 5b), sendo mais grave nos hepatócitos localizados nas regiões periportais.

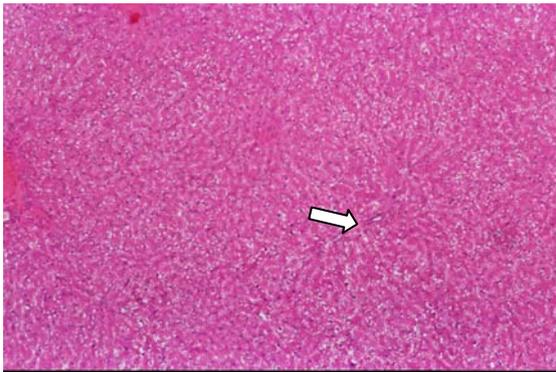


Figura 4a. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez, evidenciando tumefação celular e degeneração vacuolar dos hepatócitos, sendo mais afetados nas regiões periportais (seta). HE, 100x.

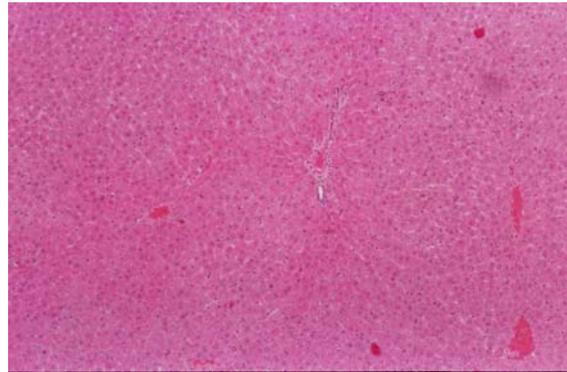


Figura 4b. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rata do grupo controle (água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez). HE, 100x.

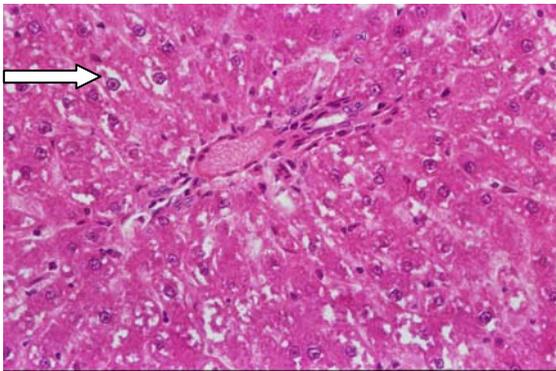


Figura 5a. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez, evidenciando tumefação celular e degeneração vacuolar dos hepatócitos (seta). HE, 400x.

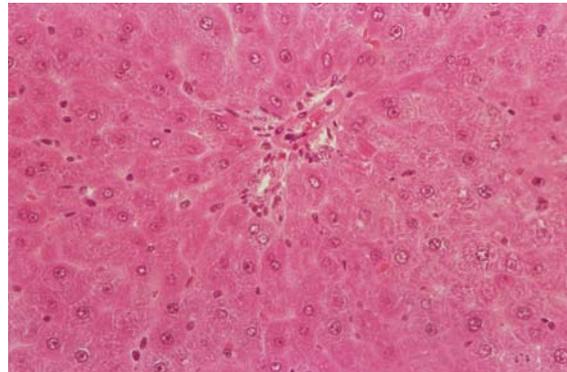


Figura 5b. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rata do grupo controle (água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez). HE, 400x.

4. Discussão

O acompanhamento dos pesos corporais é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância. O tratamento, na concentração de 8,4mg/kg, não interferiu no peso materno, pois quando o peso do útero gravídico foi descontado, o peso corrigido mostrou-se semelhante entre os três grupos experimentais. Sendo assim, a redução significativa encontrada no peso materno do tratamento 1 – 15º ao 20º dias de prenhez – indica efeito tóxico sobre o ganho de peso fetal, uma vez que o período fetal é caracterizado

pelo rápido ganho de peso, sugerindo grande acúmulo de tecido adiposo subcutâneo, evento predominante no segundo terço deste período, conforme Moore e Persaud (2004).

Os parâmetros hematológicos semelhantes entre os grupos indicam que o extrato não produziu efeito hematotóxico, além disso, todos os resultados se mantiveram dentro dos valores de referência para a linhagem e a idade (Sanderson e Phillips, 1981).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, o fato das ratas não estarem em jejum alimentar nas horas que antecederam à anestesia e coleta de sangue pode explicar o aumento, acima dos valores de referência (Loeb e Quimby, 1999), dos níveis de uréia no soro dos animais dos três grupos experimentais, uma vez que a uréia é um produto do metabolismo do nitrogênio, sendo sua dosagem influenciada pela dieta. Este procedimento foi adotado para minimizar o estresse, podendo ser realizado em virtude da interferência da lipemia nos testes bioquímicos clínicos geralmente não constituir um problema comum em ratos, diferentemente do que se verifica em outras espécies (Waner e Nyska, 1994).

Por outro lado, o aumento significativo nos níveis séricos de uréia associado ao aumento do peso dos rins dos animais tratados do 1º ao 19º DP (tratamento 1) pode indicar alteração no funcionamento renal, sendo esta confirmada pelas alterações histopatológicas encontradas no órgão. Embora também tenham ocorrido alterações histopatológicas significativas nos rins das ratas tratadas do 6º ao 15º DP (tratamento 2), a não observação de aumento significativo nos níveis séricos de uréia, possivelmente, se deve à suspensão do tratamento com extrato hidroetanólico de *B. trimera* quatro dias antes do final do tratamento 1, possibilitando que o órgão se recuperasse da influência do extrato, o que se refletiu no momento da coleta de sangue neste grupo.

O rim é particularmente vulnerável aos efeitos de agentes tóxicos, devido à alta taxa de perfusão e à habilidade de concentrar muitas substâncias na luz tubular (Finco, 1997), o que pode se agravar na gestação, devido ao aumento fisiológico de até 50% na taxa de filtração

glomerular (Hyttén, 1984). Esta alteração fisiológica pode estar relacionada ao aparecimento de alterações histopatológicas em três animais do grupo controle (25%). Entretanto, a observação de 91,7% e 81,8% de alterações nos rins dos animais dos tratamentos 1 e 2, respectivamente, sugere que as alterações renais observadas, possivelmente, se desenvolveram por ação tóxica do extrato hidroetanólico de *B. trimera* sobre o órgão, sugerindo a ocorrência de vasoconstrição e contração do mesângio, ocasionando redução na área de superfície glomerular eficaz e, conseqüentemente, redução na taxa de filtração glomerular, elevando os níveis séricos de uréia, conforme descrito por Nissensson (1998).

O material granuloso amorfo eosinofílico presente no espaço da cápsula de Bowman é sugestivo de perda de proteínas que possivelmente foi causada pela perda das interações adesivas das células epiteliais viscerais com a membrana basal glomerular com conseqüente separação destas, conforme descrições de Cotran et al. (1996), podendo ter sido induzida pela exposição ao extrato hidroetanólico de *B. trimera* na concentração de 8,4mg/kg.

A destruição das microvilosidades dos túbulos proximais evidenciada nos tratamentos resultou da lesão química causada pelo extrato hidroetanólico de *B. trimera*, uma vez que os túbulos proximais são particularmente susceptíveis a ação de agentes tóxicos, pois estes são frequentemente reabsorvidos neste local (Maxie, 1993). No entanto, a lesão do epitélio tubular observada após ingestão do extrato hidroetanólico de *B. trimera* pode ser caracterizada como lesão reversível, conforme descrito por Maxie (1993).

Outra alteração sugestiva do efeito tóxico do extrato hidroetanólico de *B. trimera* foi a presença de depósitos de material granuloso eosinofílico na luz tubular que, comumente consistem de células epiteliais descamadas e debris celulares, como membranas da borda em escova e organelas intracelulares, combinadas com proteínas intratubulares (Cowgill e Elliott, 2004). A presença desses depósitos na luz tubular, possivelmente levou à obstrução dos túbulos renais, dificultando o fluxo do filtrado glomerular e aumentando a pressão hidrostática

intratubular, ocasionando extravasamento retrógrado do fluido intratubular, agravando ainda mais a lesão glomerular, o que está de acordo com a descrição de Cowgill e Elliott (2004).

O fígado, por ser o principal órgão responsável pelo metabolismo e pela detoxificação de xenobióticos, está sujeito a danos induzidos por enorme variedade de substâncias químicas (Tennant, 1997). Na gestação esta susceptibilidade está aumentada, uma vez que neste período há um decréscimo no metabolismo hepático e uma redução de até 60% no nível de albumina plasmática, aumentando a proporção de drogas livres no plasma da gestante (Hyttén, 1984). Estas alterações fisiológicas podem ser responsáveis pelo aparecimento das alterações histopatológicas no fígado de dois animais do grupo controle (16,7%). No entanto, as alterações histopatológicas significativas encontradas em 58,3% e 63,6% dos animais dos tratamentos 1 e 2, respectivamente, possivelmente foram decorrentes do efeito do extrato hidroetanólico de *B. trimera*, na concentração de 8,4mg/kg, sendo a tumefação celular a primeira manifestação de lesão às células, aparecendo sempre que as mesmas são incapazes de manter a homeostasia iônica e hídrica. Com o acúmulo contínuo de água dentro das células, surgem espaços claros dentro do citoplasma, levando a degeneração vacuolar, sendo reversível assim que cessada a exposição ao agente tóxico (Cotran et al., 1996).

A ausência de alterações na coloração, na consistência e no peso do fígado dos animais corrobora com Grance et al. (2004) que administraram o mesmo extrato e concentração em ratas prenhes, do 6º ao 15º DP. Além disso, as alterações observadas são iniciais e reversíveis, não sendo suficientes para alterar significativamente os níveis séricos de ALT, enzima indicadora de lesão nos hepatócitos, sendo hepato-específica no rato (Hoffmann et al., 1999), devido ao período de tratamento.

Diante do exposto, concluímos que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* administrado a ratas prenhes, na concentração de 8,4mg/kg, é tóxico para células renais e hepáticas maternas, apesar das alterações observadas serem reversíveis possibilitando à recuperação tecidual após

a suspensão da utilização do extrato. Concluímos, ainda, que essa concentração não é suficiente para causar hematotoxicidade, alterações nos pesos corporais maternos, nem toxicidade observável por critérios clínicos.

5. Referências

- Almeida, E.R., 1993. Plantas medicinais brasileiras. Hemus, São Paulo, 341p.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L., 1996. Robbins Patologia Estrutural e Funcional. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 834-891.
- Cowgill, L.D., Elliott, D.A., 2004. Insuficiência Renal Aguda. In: S.J. Ettinger and E.C. Feldman (Eds.) Tratado de Medicina Interna Veterinária, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 1701-1720.
- Finco, D.R., 1997. Kidney Function. In: J.J. Kaneko, J.W. Harvey, M.L. Bruss (Eds.) Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Academic Press, San Diego, pp. 441-484.
- Gamberini, M.T., Skorupa, L.A., Souccar, C., Lapa, A.J., 1991. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis trimera* Mart. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 86, 137-139.
- Gené, R.M., Cartañá, C., Adzet, T., Marín, E., Parella, T., Cañigüeral, S., 1996. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. Planta Medica 62, 232-235.
- Grance, S.R.M., Barros, A.L.C., Martins, F.I., Matida E.T.; Trulli, E.O., Teixeira, M.A., Carvalho, T.B.S., Cunha-Laura, A.L., 2004. Efeito do extrato de carqueja (*Baccharis trimera*) em ratas prenhes. Revista Universidade Rural 24, 209-210.
- Hoffmann, W.E., Wilson, B.W., Solter, P.F., 1999. Clinical Enzymology. In: W.F. Loeb and F.W. Quimby (Eds.) The Clinical Chemistry of Laboratory Animals, Philadelphia, Taylor & Francis, pp. 399-454.
- Hyttén, F.E., 1984. Physiological changes in the mother related to drug handling. In: B. Krauer (Eds.) Drugs and Pregnancy, New York, Academic Press, p. 7.
- National Research Council., 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press, Washington, 140p.
- Nissensson, A.R., 1998. Acute renal failure: Definition and pathogenesis. Kidney International 53 (66), S7-S10.

- Loeb, W.F., Quimby, F.W., 1999. The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. Taylor & Francis, Philadelphia, pp. 643-726.
- Manson, J.M., Kang, Y.J., 1989. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: A.W. Hayes (Eds.) Principles and methods of toxicology, Raven Press, New York, pp. 311-359.
- Maxie, M.G., 1993. The Urinary System. In: K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy, N. Palmer (Eds.) Pathology of Domestic Animals, v. 2, Academic Press, San Diego, pp. 447-538.
- Moore, K.L., Persaud, T.V.N., 2004. Embriologia Clínica. Elsevier, Rio de Janeiro, 609p.
- Oliveira, A.C.P., Endringer, D.C., Amorim, L.A.S., Brandão, M.G.L., Coelho, M.M., 2005. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. Journal of Ethnopharmacology 102, 465-469.
- Sanderson, J.H., Phillips, C.E., 1981. An atlas of laboratory animal haematology. Oxford University Press, New York, pp. 38-87.
- Soicke, H., Leng-Peschlow, E., 1987. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. Planta Medica 53, 37-39.
- Tennant, B.C., 1997. Hepatic Function. In: J.J. Kaneko, J.W. Harvey, M.L. Bruss (Eds.) Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Academic Press, San Diego, pp. 327-352.
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1991. Guidelines for developmental toxicity risk assessment. Federal Register 56(234):63798-63826.
- Waner, T., Nyska, A., 1994. The influence of fasting on blood glucose, triglycerides, cholesterol and alkaline phosphatase in rats. Veterinary Clinical Pathology 23, 78-80.

Efeito tóxico de *Baccharis trimera* em ratas prenhes e seus conceptos

**Simone Reschke Mendes Grance^{a3}, Maria Araújo Teixeira^b, Roseana Silveira Leite^b,
Rodrigo Juliano Oliveira^c, Véssia da Silva Leite^d, Mariana Pereira Ribeiro^e,
Valter Joost van Onselen^f, Andréa Luiza Cunha-Laura^g, João Máximo de Siqueira^h**

^a Mestranda do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cx Postal 549, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^b Biotério Central, UFMS, Cidade Universitária, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^c Departamento de Biomedicina, Centro Universitário Filadélfia, Rua Alagoas 2050, Londrina, PR, 86020-430, Brasil

^d Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Cx Postal 6001, Londrina, PR, 86051-990, Brasil

^e Graduanda em Ciências Biológicas, UFMS, Cidade Universitária, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^f Departamento de Zootecnia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Cx Postal 549, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^g Departamento de Biologia, UFMS, Cidade Universitária, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^h Departamento de Farmácia e Bioquímica, UFMS, Cidade Universitária, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

Resumo

Neste trabalho foi avaliado o efeito do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera*, na concentração de 8,4mg/kg, em ratas prenhes e prole tratados do 1º ao 19º e do 6º ao 15º dias de prenhez (tratamentos 1 e 2, respectivamente) em comparação com controles (água destilada). Foram analisados pesos maternos nos dias 1, 6, 15 e 20 de gestação; peso de ovários e útero; peso e histologia de fígado e rins; contagem, peso, tamanho e avaliação externa, visceral e esquelética dos fetos. Houve alteração no peso dos rins no tratamento 1 e na histopatologia renal e hepática em ambos os tratamentos. Foi observada redução na implantação e aumento nas perdas pré-implantação no tratamento 1. Foi detectada placentomegalia em ambos tratamentos, aumento na ocorrência de malformações viscerais e variações esqueléticas, redução no peso e tamanho fetal e na ossificação no tratamento 1. Os resultados revelam que o extrato hidroetanólico de *B. trimera*, na concentração utilizada, é tóxico para gestantes e para o desenvolvimento embrionário, sendo que as alterações encontradas na prole possivelmente não sejam efeito direto do extrato, e sim consequência da toxicidade materna induzida por este.

Palavras-chave: *Rattus norvegicus*, Asteraceae, Embriotoxicidade, Fetotoxicidade.

³ Correspondência para o autor: Rua Aldagro, 38. Campo Grande, MS, 79115-280
Tel. +55 67 99585282; fax: +55 67 33183000
E-mail: simonermg@yahoo.com.br

Toxic effect of *Baccharis trimera* on pregnant rats and conceptus

**Simone Reschke Mendes Grance^{a4}, Maria Araújo Teixeira^b, Roseana Silveira Leite^b,
Rodrigo Juliano Oliveira^c, Véssia da Silva Leite^d, Mariana Pereira Ribeiro^e,
Valter Joost van Onselen^f, Andréa Luiza Cunha-Laura^g, João Máximo de Siqueira^h**

^a Mestranda do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cx Postal 549, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^b Biotério Central, UFMS, Cidade Universitária, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^c Departamento de Biomedicina, Centro Universitário Filadélfia, Rua Alagoas 2050, Londrina, PR, 86020-430, Brasil

^d Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Cx Postal 6001, Londrina, PR, 86051-990, Brasil

^e Graduanda em Ciências Biológicas, UFMS, Cidade Universitária, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^f Departamento de Zootecnia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Cx Postal 549, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^g Departamento de Biologia, UFMS, Cidade Universitária, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

^h Departamento de Farmácia e Bioquímica, UFMS, Cidade Universitária, Cx Postal 649, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil

Abstract

The present study investigated the hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* on pregnant rats when administered at a concentration of 8.4 mg/kg from gestational day (GD) 1 to 19 and 6 to 15 (treatments 1 and 2, respectively), as compared to controls given distilled water. Maternal body weights were recorded on GD 1, 6, 15 and 20. Ovaries and uterus were weighed; liver and kidneys were weighed and examined microscopically; fetuses were counted, weighed, measured, and evaluated for external, visceral, and skeletal alterations. Changes were found in kidneys weight in treatment 1 and in hepatorenal histopathological features in both treatments. Implantation rate was decreased and preimplantation loss rate was increased in treatment 1. Placentomegaly was detected in both treatments, whereas in treatment 1 visceral malformations and skeletal variations were increased and fetal weight and size and ossification were decreased. The results revealed that the hydroethanolic extract of *B. trimera* at the concentration tested exhibits maternal and embryofetal toxicity, although the alterations observed in the offspring may not be a direct effect of the extract, but rather a consequence of its toxicity against the maternal organism.

Keywords: *Rattus norvegicus*, Asteraceae, Embryotoxicity, Fetotoxicity.

⁴ Correspondência para o autor: Rua Aldagro, 38. Campo Grande, MS, 79115-280
Tel. +55 67 99585282; fax: +55 67 33183000
E-mail: simonermg@yahoo.com.br

1. Introdução

Baccharis trimera (Less) DC, conhecida popularmente como carqueja, é uma espécie amplamente utilizada na medicina popular para dores no estômago, azia, má-digestão, gastrite, anemia, inflamação, dores no fígado, diabete, reumatismo (Simões et al., 1998). Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, *B. trimera* é a segunda planta mais comercializada pela população local (Nunes et al., 2003) na forma de infusão ou decocto, sendo utilizada inclusive durante a gestação.

A toxicidade materna – definida como uma alteração transitória ou permanente na fisiologia materna com potencial para causar efeitos adversos nas proles durante o desenvolvimento embrionário ou fetal – está intimamente associada com aparecimento de malformações. Por isso, para avaliar a ocorrência de efeitos tóxicos de substâncias químicas na gestação analisam-se, inicialmente, os efeitos sobre o organismo materno (Khera, 1985).

A condição hormonal das mães também é necessária para o bom desenvolvimento embrionário, sendo amplamente conhecido que níveis sanguíneos de progesterona inadequados interferem na viabilidade do embrião, por não permitirem que o endométrio seja adequadamente preparado para a sustentação da gestação (Kato et al., 1979).

A exposição a um agente químico durante a gestação pode ter diferentes efeitos no desenvolvimento pré-natal dependendo da dose administrada e da duração da exposição e do período gestacional, sendo o período da organogênese o mais sensível à ação de agentes externos por ser a fase de formação dos órgãos e tecidos (Sadler, 2005).

De acordo com a classificação das alterações no desenvolvimento, a malformação é uma alteração permanente e afeta adversamente a saúde ou a sobrevivência, enquanto que variação é o termo usado para alterações transitórias que não afetam adversamente a saúde ou a sobrevivência (Chahoud et al., 1999). Agentes capazes de causar malformações são considerados teratogênicos, ao passo que agentes causadores de variações são considerados embriotóxicos (Manson e Kang, 1989).

Outra manifestação do desenvolvimento anormal do concepto é a morte, podendo este ser abortado ou reabsorvido. No segundo caso, após a morte embrionária o corpo lúteo persiste e as membranas tornam-se atrofiadas e secas, sendo o líquido amniótico e o embrião reabsorvidos. O útero compacta-os e molda-os em uma massa seca e contorcida, tornando-os mumificados (Arthur, 1979).

Face ao exposto justifica-se pesquisar os efeitos de *B. trimera* na gestação, principalmente quando se considera que essa planta é muito utilizada pela população local e, não há

informações disponíveis sobre a dosagem consumida, o tempo de utilização e a possibilidade de ação tóxica para a gestante e sua prole.

O presente estudo avaliou o efeito do extrato hidroetanólico de *B. trimera* na gestação de ratas, sendo investigada também a ocorrência de malformações e/ou variações no desenvolvimento da prole das ratas submetidas à ingestão do extrato no período da organogênese e durante toda gestação.

2. Material e métodos

2.1. Coleta da planta e preparação do extrato

A parte aérea de *Baccharis trimera* foi coletada no Horto de Plantas Medicinais (HPM) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Dourados – MS, nas primeiras horas da manhã, pela Dra. Maria do Carmo Vieira. A exsicata de número 905 está depositada no Herbário DDMS, em Dourados – MS. A seguir, a planta foi seca em estufa de circulação de ar forçada, à temperatura de 36 a 38°C. No Laboratório de Farmacognosia da UFMS, em Campo Grande, o material vegetal foi intumescido em solvente etanol 70° GL, seguido de maceração, percolação, eliminação do solvente em rota-evaporador e secagem em dessecador. A massa resultante foi dividida em alíquotas de 8,4mg/kg e diluídas em 0,3mL de água destilada, sendo as alíquotas estocadas e conservadas a –5°C até sua utilização.

2.2. Animais

As 35 ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar nulíparas, heterogênicas, com idade média de quatro meses e peso médio de 250g, foram obtidas no Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e mantidas no Biotério de Experimentação da UFMS. Durante a aclimatação, os animais foram alojados em gaiolas plásticas (490x340x160mm), com temperatura ambiente aproximadamente constante (22°C ± 2°C), umidade relativa de 55-75% e fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro. Os ratos receberam ração granulada para ratos (Nuvilab-CR1, Nuvital Ltda, Curitiba, PR, Brasil) e água à vontade. O protocolo nº:112/2006 para uso de animais em experimentação foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS e também está de acordo com National Research Council (1996).

2.3. Protocolo experimental

As ratas foram acasaladas durante seis horas, na proporção de 1 macho: 2 fêmeas. A observação de espermatozoides no esfregaço vaginal foi a confirmação da prenhez, sendo este o dia zero da gestação (Taylor, 1986). Posteriormente, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: tratamento 1 – com 12 animais, tratamento 2 – com 11 animais e controle – com 12 animais.

No tratamento 1 as ratas receberam 0,3mL/dia do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (EHBT) na concentração de 8,4mg/kg, por via oral, do 1º ao 19º dias de prenhez (DP). No tratamento 2 as ratas receberam 0,3mL/dia, do EHBT na concentração de 8,4mg/kg, por via oral, do 6º ao 15º DP. No grupo controle as ratas receberam 0,3mL/dia de água destilada nos mesmos dias do tratamento 1, também por via oral.

Neste período, os animais foram inspecionados duas vezes ao dia para observação de indicativos clínicos de toxicidade: piloereção, alterações de atividade locomotora, ocorrência de diarreia, hipotermia e morte (Manson e Kang, 1989).

As ratas, de ambos os tratamentos, foram pesadas nos dias 1, 6, 15 e 20 de gestação. No 20º dia de gestação, os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico, sendo realizada a laparotomia exploratória e a ovariectomia. Então, os ovários foram dissecados, pesados e foi contado o número de corpos lúteos. O útero foi pesado com os conceitos e, após a onfalectomia, sem os conceitos, para o cálculo do ganho de peso corrigido (ganho de peso 1º ao 20º dias de prenhez menos o peso dos conceitos). Em seguida, registrou-se número de fetos vivos e mortos, número de sítios de implantação e número de reabsorções. A seguir, todos os fetos e suas respectivas placentas foram pesados individualmente, medidos e inspecionados, sistematicamente, com o auxílio de um estereomicroscópio para a verificação das anomalias estruturais externas. A partir desses dados, foram calculadas taxa de implantação (número de implantações/número de corpos lúteos x 100), taxa de reabsorção (número de reabsorções/número de corpos lúteos x 100), taxa de perdas pré-implantação (número de corpos lúteos – número de implantações/número de corpos lúteos x 100), taxa de perdas pós-implantação (número de implantações – número de fetos vivos/número de implantações x 100) e índice placentário (peso placentário/peso fetal).

Após a ovariectomia, as ratas foram eutanasiadas por exsanguinação, sendo rins e fígado maternos removidos, pesados e inspecionados quanto à forma, coloração e consistência.

Então, a prole foi aleatoriamente distribuída em três grupos, sendo aproximadamente 40%

destinado à análise visceral, 35% à análise esquelética e 25% à análise histológica. O primeiro grupo foi fixado em solução de Bodian e analisado através de cortes/microdissecção proposta por Barrow & Taylor (1969) para o estudo de tórax e abdômen e pelos cortes estratégicos propostos por Wilson (1965) para estudo de cabeça. A classificação das alterações viscerais baseou-se, principalmente, nos trabalhos de Taylor (1986) e Manson & Kang (1989). O segundo grupo foi destinado à análise esquelética através da técnica de Alizarina red descrita por Staples & Schnell (1964). Os exames das vísceras e esqueletos fetais foram realizados em lupa estereomicroscópica. O terceiro grupo foi fixado em solução de Bouin e, após o processamento histológico, foram realizados cortes da região abdominal dos fetos para observação de fígado, baço, rins e estruturas adjacentes.

Concluída a necropsia foram retirados fragmentos representativos dos órgãos maternos, que foram fixados em solução de Bouin, desidratados, diafanizados e emblocados em parafina. A seguir, foram realizados cortes histológicos, que foram corados com hematoxilina e eosina, para observação de possíveis alterações por meio de microscopia óptica.

2.4. Análise estatística

Para a comparação dos resultados quantitativos foram utilizados testes paramétricos (ANAVA) e não paramétricos (Teste de Kruskal-Wallis), conforme a natureza da distribuição dos dados. Após a detecção de diferenças pela ANAVA e pelo Teste de Kruskal-Wallis, foram utilizados o teste de comparação múltipla de Tukey e o teste de comparação múltipla de Dunn, respectivamente. Para análise dos dados relativos aos fetos, a ninhada foi utilizada como unidade-base, conforme recomenda a literatura especializada (Manson e Kang, 1989). As proporções foram analisadas pelo Teste Qui-Quadrado ou, alternativamente, pelo Teste Exato de Fisher. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Durante o período de tratamento, nenhuma morte materna foi registrada. Não foram observados distúrbios gastrointestinais, piloereção, alterações na temperatura e na atividade locomotora das ratas.

Os pesos corporais maternos diferiram significativamente no tratamento 1 somente no período do 15° ao 20° DP (Figura 1).

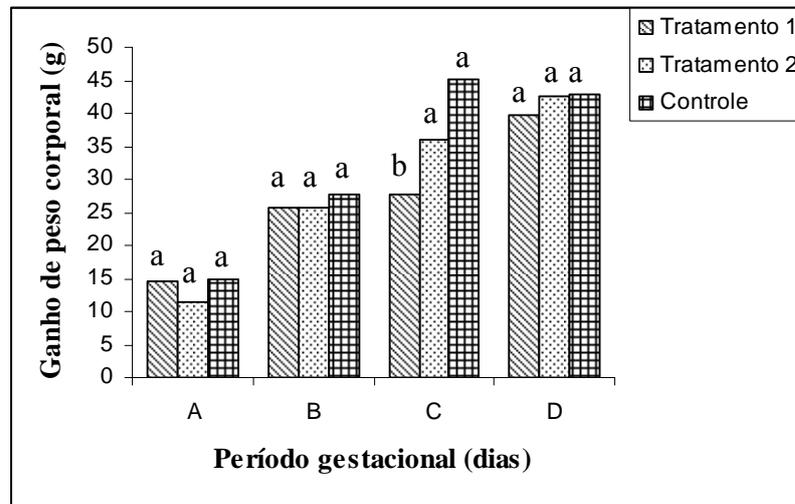


Figura 1. Ganho de peso corporal materno nos períodos gestacionais (dias de prenhez): A – 1° ao 6°, B – 6° ao 15°, C – 15° ao 20° e D – 1° ao 20° (ganho de peso materno sem o peso dos conceitos).

Tratamento 1: 8,4mg/kg de extrato hidroetanólico de *B. trimera* do 1° ao 19° dias de prenhez;

Tratamento 2: 8,4mg/kg de extrato hidroetanólico de *B. trimera* do 6° ao 15° dias de prenhez;

Controle: água destilada do 1° ao 19° dias de prenhez.

a,b no mesmo período gestacional indicam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$)

Não foram encontradas diferenças no que se refere à análise macroscópica de rins e fígado maternos. O peso dos rins dos animais do tratamento 1 e o peso do útero com e sem conceitos de ambos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle (Tabela 1).

Tabela 1. Peso (média \pm desvio padrão) dos órgãos das ratas (g).

	Tratamento 1 (n=12)	Tratamento 2 (n=11)	Controle (n=12)
Peso do rim direito	0,82 \pm 0,08 ^b	0,76 \pm 0,09 ^a	0,73 \pm 0,05 ^a
Peso do rim esquerdo	0,76 \pm 0,08 ^b	0,74 \pm 0,08 ^a	0,72 \pm 0,06 ^a
Peso do fígado	13,43 \pm 1,86 ^a	12,32 \pm 1,37 ^a	12,92 \pm 1,42 ^a
Peso dos ovários	0,13 \pm 0,02 ^a	0,12 \pm 0,02 ^a	0,11 \pm 0,01 ^a
Peso do útero com conceitos	33,12 \pm 15,48 ^b	34,82 \pm 12,29 ^b	51,27 \pm 10,20 ^a
Peso do útero sem conceitos	3,80 \pm 1,07 ^b	4,05 \pm 0,74 ^b	5,04 \pm 0,56 ^a

Tratamento 1 – 8,4mg/kg de extrato hidroetanólico de *B. trimera* do 1° ao 19° dias de prenhez (DP), tratamento 2 – 8,4mg/kg de extrato hidroetanólico de *B. trimera* do 6° ao 15° DP e controle – água destilada do 1° ao 19° DP.

Legenda: letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa, sendo $p < 0,05$ (Teste de Tukey)

Em relação à análise microscópica dos órgãos maternos, ocorreram alterações histopatológicas em 91,7% e em 81,8% dos rins dos animais dos tratamentos 1 e 2,

respectivamente, e em 58,3% e 63,6% do fígado dos animais dos tratamentos 1 e 2, respectivamente, diferindo significativamente quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$, Teste de Qui-Quadrado). Também foram observadas alterações histopatológicas em 25% dos rins e em 16,7% do fígado dos animais do grupo controle.

O exame histopatológico do rim revelou a presença de material granuloso amorfo eosinofílico no espaço da cápsula de Bowman e hiperemia dos capilares glomerulares. As células do epitélio tubular evidenciaram tumefação e desaparecimento da borda em escova. Os túbulos proximais mais intensamente afetados apresentaram luz com depósito de material granuloso amorfo eosinofílico, discretamente refringente. A histopatologia do fígado revelou tumefação celular difusa tendendo para degeneração vacuolar, sendo mais grave nos hepatócitos localizados nas proximidades das regiões periportais.

Os parâmetros relativos à fertilidade e ao desenvolvimento fetal estão apresentados na Tabela 2. O número de fetos vivos, a taxa de implantação e a taxa de perdas pré-implantação diferiram estatisticamente entre os animais do tratamento 1 e o grupo controle. O peso e o comprimento dos fetos das mães do tratamento 1 foram significativamente inferiores ao peso e ao comprimento dos fetos das mães do controle. 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. Também foi observada placentomegalia em ambos os tratamentos comparados com o controle (Figura 2).



Figura 2. Fotografia de feto de rata tratada com 8,4mg/kg de EHBHT do 6º ao 15º dias de prenhez (tratamento 2) evidenciando placentomegalia, comparado ao feto de rata tratada com água destilada (controle).

Tabela 2. Parâmetros (média \pm desvio padrão) relativos à fertilidade e ao desenvolvimento fetal.

Parâmetros	Tratamento 1 (n=12)	Tratamento 2 (n=11)	Controle (n=12)
Número de corpos lúteos	13,00 \pm 1,71 ^a	11,73 \pm 1,10 ^a	12,42 \pm 0,90 ^a
Número de fetos vivos	6,67 \pm 4,31 ^b	6,82 \pm 2,71 ^a	9,92 \pm 1,51 ^a
Taxa de implantação (%)	78,29 \pm 21,17 ^b	84,16 \pm 19,93 ^a	96,05 \pm 4,13 ^a
Taxa de reabsorção (%)	33,37 \pm 24,87 ^a	31,07 \pm 14,84 ^a	16,06 \pm 12,29 ^a
Perdas pré-implantação (%)	21,71 \pm 21,17 ^b	15,84 \pm 19,93 ^a	3,95 \pm 4,13 ^a
Perdas pós-implantação (%)	34,21 \pm 25,64 ^a	32,21 \pm 15,83 ^a	16,76 \pm 11,51 ^a
Peso fetal (g)	2,68 \pm 0,51 ^b	2,90 \pm 0,56 ^a	3,24 \pm 0,25 ^a
Comprimento fetal (cm)	3,37 \pm 0,29 ^b	3,48 \pm 0,30 ^a	3,65 \pm 0,12 ^a
Peso placentário (g)	0,55 \pm 0,11 ^b	0,51 \pm 0,07 ^b	0,46 \pm 0,04 ^a
Índice placentário	0,21 \pm 0,06 ^b	0,18 \pm 0,02 ^b	0,14 \pm 0,01 ^a

Tratamento 1 – 8,4mg/kg de extrato hidroetanólico de *B. trimera* do 1º ao 19º dias de prenhez (DP), tratamento 2 – 8,4mg/kg de extrato hidroetanólico de *B. trimera* do 6º ao 15º DP e controle – água destilada do 1º ao 19º DP. Legenda: letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa, sendo $p < 0,05$ (Teste de Tukey)

Ao exame macroscópico dos fetos foi encontrada displasia ectodérmica, sendo que a ocorrência no tratamento 1 foi 4,8% (4/84) e no tratamento 2 foi 8% (6/75).

Na análise visceral foram detectadas alterações no pólo cefálico, sendo que a ocorrência de hidrocefalia moderada (Figura 3a) foi significativamente maior no tratamento 2, enquanto que a ocorrência de hidrocefalia severa (Figura 3b) diferiu estatisticamente em ambos os tratamentos em relação ao controle (Figura 3c), conforme Tabela 3.

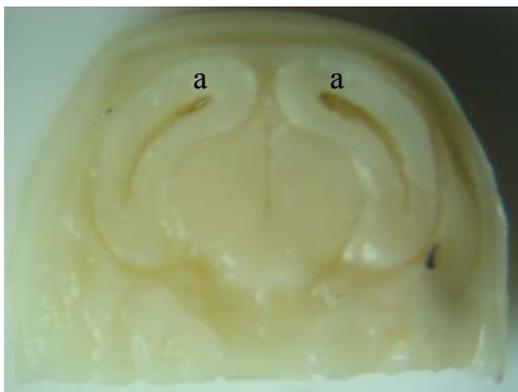


Figura 3a. Secção de cabeça de feto de rato tratada com 8,4mg/kg de EHBt do 6º ao 15º dias de prenhez evidenciando hidrocefalia moderada com dilatação de ventrículos laterais (a).

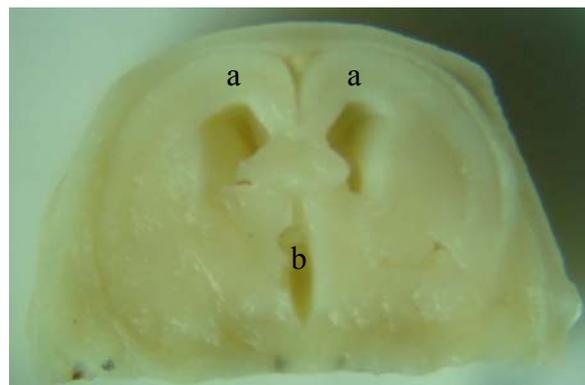


Figura 3b. Secção de cabeça de feto de rato tratada com 8,4mg/kg de EHBt do 6º ao 15º dias de prenhez evidenciando hidrocefalia severa com dilatação de ventrículos laterais (a) e terceiro ventrículo (b).

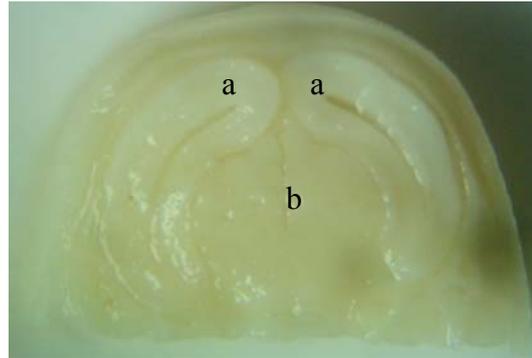


Figura 3c. Secção de cabeça de feto de rata tratada com água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez evidenciando ventrículos laterais (a) e terceiro ventrículo normais (b).

Tabela 3. Número de fetos analisados e ocorrência (%) de anormalidades viscerais na prole de ratas dos diferentes grupos experimentais.

	Tratamento 1	Tratamento 2	Controle
Número de fetos analisados	39	31	49
Hidrocefalia leve	15,4	9,7	10,2
Hidrocefalia moderada	17,9	29,0 *	10,2
Hidrocefalia severa	23,1 *	29,0 *	6,12
Fenda palatina	0	3,2	2,0
Hidronefrose	17,9	32,3	14,3
Coração globoso	5,1	9,7	0

Tratamento 1 – 8,4mg/kg de extrato hidroetanólico de *B. trimera* do 1º ao 19º dias de prenhez (DP), tratamento 2 – 8,4mg/kg de extrato hidroetanólico de *B. trimera* do 6º ao 15º DP e controle – água destilada do 1º ao 19º DP.

* $p < 0,05$ comparado ao controle. (Teste Qui-Quadrado ou, alternativamente, Teste Exato de Fisher)

A análise esquelética revelou diferença estatística entre tratamento 1 e controle na ocorrência de ausência de ossificação de bulba timpânica e redução de ossificação de pterigóide e basosfenóide (Figura 4a e 4b) e redução de ossificação de parietal, interparietal (Figura 5a e 5b) e esternóbrios (Figura 5c). O tratamento 2 diferiu do controle na ocorrência de parietal, interparietal (Figura 6a e 6b) e supraoccipital (Figura 6c) irregulares (Tabela 4).

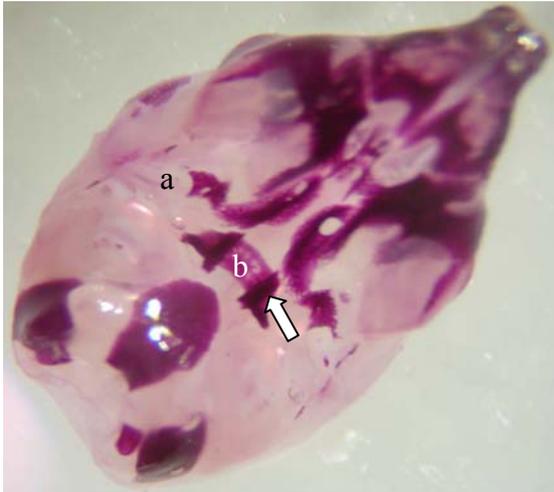


Figura 4a. Base do crânio de feto de rato tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 1º ao 19º dias de prenhez evidenciando ausência de ossificação em bulba timpânica (a) e redução de ossificação em pterigóide (seta) e basosfenóide (b).



Figura 4b. Base do crânio de feto de rato tratada com água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez evidenciando ossificação normal em bulba timpânica (a), pterigóide (seta) e basosfenóide (b).



Figura 5a. Dorso do crânio de feto de rato tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º dias de prenhez evidenciando redução de ossificação em parietal (a) e interparietal (b).



Figura 5b. Dorso do crânio de feto de rato tratada com água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez evidenciando ossificação normal em parietal (a) e interparietal (b).

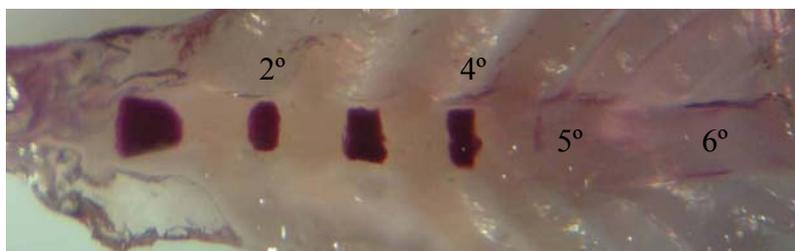


Figura 5c. Esternébrrios de feto de rato tratada com 8,4mg/kg de EHBT do 6º ao 15º dias de prenhez evidenciando redução de ossificação em 2º e 4º e ausência de ossificação em 5º e 6º.



Figura 6a. Dorso do crânio de feto de rata tratada com 8,4mg/kg de EHTB do 6º ao 15º dias de prenhez evidenciando ossificação irregular em parietal (setas) e interparietal (a).



Figura 6b. Dorso do crânio de feto de rata tratada com água destilada do 1º ao 19º dias de prenhez evidenciando ossificação normal em parietal (a) e interparietal (b).

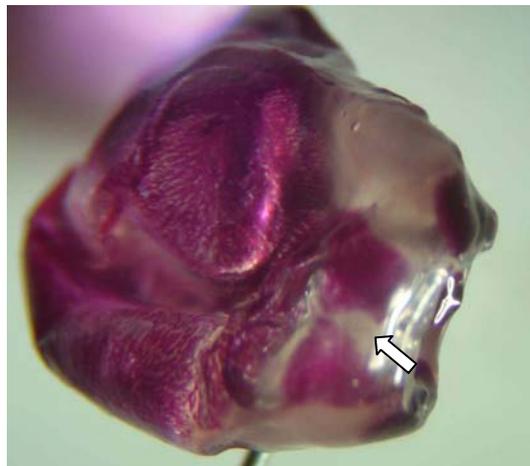


Figura 6c. Região caudal do crânio de feto de rata tratada com 8,4mg/kg de EHTB do 6º ao 15º dias de prenhez evidenciando ossificação irregular em supraoccipital (seta).

Tabela 4. Número de fetos analisados e ocorrência (%) de anormalidades esqueléticas na prole de ratas dos diferentes grupos experimentais.

	Tratamento 1	Tratamento 2	Controle
Número de fetos analisados	28	25	40
Cabeça			
Bulba timpânica (ausência de ossificação)	21,4*	4,3	2,5
Pterigóide (redução de ossificação)	21,4*	4,3	2,5
Basosfenóide (redução de ossificação)	21,4*	4,3	2,5
Hióide (ausência do corpo)	0	1,1	0
Frontal (ossificação reduzida)	10,7	1,1	0
Parietal			
(ossificação reduzida)	25,0*	3,2	5,0
(irregular)	0	4,3*	0
(separado)	3,6	1,1	2,5
Interparietal			
(ausência de ossificação)	0	1,1	0
(ossificação reduzida)	21,4*	3,2	2,5
(irregular)	0	4,3*	0
(separado)	3,6	1,1	2,5
Supraoccipital			
(ausente)	0	2,2	5,0
(ausência de ossificação)	0	1,1	0
(ossificação reduzida)	0	3,2	0
(irregular)	7,1	4,3*	0
(separado)	10,7	0	0
Esterno			
(número de esternóbrios anormal)	17,9	9,7	20,0
(esternóbrios com ossificação reduzida)	57,1*	3,2	2,5
(esternóbrios irregulares)	10,7	4,3	15,0
(esternóbrios fundidos)	3,6	1,1	2,5
(esternóbrios reduzidos)	28,6	4,3	17,5
(esternóbrios separados)	7,1	1,1	0
(esternóbrios em borboleta)	3,6	0	2,5
(esternóbrios em escada)	0	0	7,5
(ausente)	0	1,1	2,5
Vértebras (número de vértebras anormal)	0	3,2	0
Costelas (rudimentar)	3,6	1,1	0

Tratamento 1 – 8,4mg/kg de extrato hidroetanólico de *B. trimera* do 1º ao 19º dias de prenhez (DP), tratamento 2 – 8,4mg/kg de extrato hidroetanólico de *B. trimera* do 6º ao 15º DP e controle – água destilada do 1º ao 19º DP.

* $p < 0,05$ comparado ao controle. (Teste Qui-Quadrado ou, alternativamente, Teste Exato de Fisher)

O exame histológico dos fetos não revelou alterações histopatológicas entre os animais tratados e controle.

4. Discussão

Como não foram observados sinais clínicos indicativos de toxicidade materna em nenhum dos grupos analisados, pode-se supor que a administração de extrato hidroetanólico de *B. trimera*, na concentração de 8,4mg/kg, não causou efeitos tóxicos maternos observáveis por critérios clínicos, conforme descrição de Manson e Kang (1989).

O tratamento não interferiu no ganho de peso materno, pois quando o peso do útero gravídico foi descontado, o peso corrigido mostrou-se semelhante entre os três grupos experimentais. Sendo assim, a redução significativa encontrada no peso materno do tratamento 1 – 15º ao 20º dias de prenhez – indica efeito tóxico sobre o peso fetal, uma vez que o período fetal é caracterizado pelo rápido ganho de peso, ocasionado pelo grande acúmulo de tecido adiposo subcutâneo, evento predominante no segundo terço deste período, conforme Moore e Persaud (2004).

As alterações detectadas no peso dos rins e na avaliação histopatológica de rins e fígado das mães expostas a ambos os tratamentos revelou que o extrato hidroetanólico de *B. trimera*, na concentração de 8,4mg/kg, possivelmente excedeu a capacidade materna de detoxificar e eliminar a substância química, alterando significativamente a homeostasia materna. As alterações observadas, caracterizadas por alteração na capacidade celular de manter a homeostasia iônica e hídrica são reversíveis, conforme descrito por Cotran et al. (1996). As alterações histopatológicas encontradas em 25% dos rins e em 16,7% do fígado dos animais do grupo controle, possivelmente sejam consequência de alterações fisiológicas da prenhez, como elevação da taxa de filtração glomerular, decréscimo do metabolismo hepático e uma redução no nível de albumina plasmática (Hyttén, 1984).

A semelhança encontrada entre peso de ovários e número de corpos lúteos nos três grupos experimentais, nos permite supor que o ambiente hormonal materno não diferiu entre os grupos, uma vez que o peso do ovário depende consideravelmente do número e do volume dos corpos lúteos, pois estes estão correlacionados com a concentração de progesterona circulante (Uchida et al., 1970), sendo a progesterona e a 20-hidroxi-progesterona hormônios indispensáveis à manutenção da prenhez na rata (Kato et al., 1979).

A redução significativa na taxa de implantação e o aumento na taxa de perdas pré-implantação observados no tratamento 1 indicam que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* alterou o processo de implantação, sendo que os oócitos liberados que foram fertilizados não resultaram em blastocistos implantados, seja por alteração no transporte ou no desenvolvimento dos blastocistos. Este achado pode estar associado ao efeito relaxante do extrato hidroetanólico de *B. trimera* na musculatura lisa da tuba uterina, interferindo no transporte do blastocisto até o útero e, conseqüentemente, com a implantação. Esse efeito relaxante na musculatura lisa já foi observado em estudos experimentais com flavonóides isolados de *B. trimera*, relatando que essas substâncias são capazes de relaxar a musculatura lisa vascular (Torres et al., 2000) e a musculatura lisa do corpo cavernoso do pênis de cobaias (Hnatyszyn et al., 2003).

Embora as taxas de perdas pré-implantação observadas no tratamento 2 também estejam altas, a não observação de significância, possivelmente, se deva ao alto valor do desvio padrão ocasionado pela constatação de animais com taxas de perdas pré-implantação variando de 0 a 66,7%, enquanto que as taxas de perdas pré-implantação no tratamento 1 variaram de 0 a 62,5%. O alto valor do desvio padrão encontrado também nas taxas de reabsorção e perdas pós-implantação, pode ser explicado pela variação percentual semelhante à encontrada nas taxas de perdas pré-implantação.

As taxas de reabsorção e de perdas pós-implantação foram semelhantes entre os três grupos experimentais, indicando que o número de embriões ou fetos que tiveram seu desenvolvimento interrompido e permaneceram no interior da cavidade uterina, não diferiu entre os tratamentos e o controle. Nas espécies múltiparas, vários fetos podem morrer e ser mumificados enquanto outros permanecem vivos, podendo os fetos mumificados serem removidos juntamente com os fetos normais vivos (Jackson, 2005).

Dentre as alterações observadas nos fetos do tratamento 1, a redução significativa no peso e comprimento fetal, associado à redução na ossificação dos ossos do crânio e esternóbrios, são indicativos fidedignos de retardo no crescimento intra-uterino – RCIU –, conforme Aliverti et al. (1979). Essas alterações associadas ao aumento significativo das perdas pré-implantação possivelmente ocorreram em consequência da toxicidade materna, pois distúrbios na fisiologia materna como alterações nas funções renal e hepática afetam a homeostasia materno-fetal, perturbando o desenvolvimento embriofetal (Khera, 1984).

O aumento de peso das placentas, detectado nos animais de ambos os tratamentos associado ao aumento do índice placentário, comprova que o crescimento fetal está associado à capacidade funcional da placenta (Neroli e Neville, 1979). O extrato hidroetanólico de *B. trimera* possivelmente alterou o desenvolvimento placentário comprometendo as trocas materno-fetais, fazendo com que os fetos se desenvolvessem em regime de hipóxia e má nutrição. Para compensar o retardo no crescimento fetal e possibilitar sua sobrevivência até o nascimento, seria necessária considerável expansão na camada de trofoblasto esponjoso essencial para a produção de hormônios ou fatores de crescimento (Ishikawa et al., 2006), resultando em placentomegalia.

A observação de maior ocorrência de hidrocefalia interna (acúmulo de líquido nos ventrículos cerebrais) moderada no tratamento 2 e severa em ambos os tratamentos, indica embriofetotoxicidade e está relacionada com o período gestacional e com a duração da exposição ao extrato hidroetanólico de *B. trimera*. O período crítico do desenvolvimento do cérebro vai do início da organogênese até aproximadamente o primeiro terço do período fetal,

no entanto, seu desenvolvimento pode ser perturbado depois deste período, pois o cérebro está em diferenciação e desenvolvimento rápido ao nascimento e continua a fazê-lo após este (Moore e Persaud, 2004). Por isso, a exposição ao tratamento do 6º ao 15º dias de prenhez, por ser o período mais susceptível, afetou maior número de animais e causou lesões moderadas e severas, enquanto que a exposição do 1º ao 19º dias de gestação, embora tenha perturbado o desenvolvimento cerebral de um número menor de animais, causou lesões mais graves e irreversíveis devido ao acúmulo gradual e contínuo de líquido nos ventrículos laterais e terceiro ventrículo (Solecki et al., 2003).

As anomalias esqueléticas evidenciadas podem ser classificadas como variações e não malformações, pois são transitórias e não adversas à sobrevivência (Chahoud et al., 1999). Redução na ossificação de esternóbrios, como observado no tratamento 1, e vértebras são reversíveis e indicativo de leve atraso no desenvolvimento, geralmente acompanhado de redução no peso fetal (Manson e Kang, 1989). Semelhante redução de ossificação ocorreu em parietal e interparietal nos animais do tratamento 1, indicando apenas atraso no desenvolvimento, enquanto que os animais do tratamento 2 apresentaram ossificação irregular de parietal, interparietal e supraoccipital, sugestivo de interferência no processo normal de ossificação dos mesmos. A ausência de ossificação de bulba timpânica e a redução de ossificação de pterigóide e basosfenóide, aumentadas nos animais do tratamento 1, também podem ser classificadas como variações, devido sua condição ser transitória (Solecki et al., 2001). De acordo com Manson e Kang (1989), estas variações geralmente ocorrem de forma secundárias a alterações na homeostasia materna.

Face ao exposto, concluímos que o extrato hidroetanólico de *B. trimera*, na concentração de 8,4mg/kg, é tóxico para rins e fígado de ratas gestantes, sendo a severidade das alterações diretamente relacionada com o tempo de exposição ao agente tóxico. Além disso, o extrato também interfere no processo de implantação dos blastocistos. A utilização do extrato, durante toda gestação, aumenta a ocorrência de malformações viscerais e variações esqueléticas, reduz o peso e tamanho fetal e a ossificação. Apesar disso, essas alterações possivelmente não sejam efeito direto do extrato, e sim consequência da toxicidade materna induzida pelo mesmo.

Contudo, a coexistência de toxicidade materna e fetal não pode a princípio ser usada para diminuir a significância dos efeitos embriofetotóxicos.

5. Referências

- Aliverti, V., Bonanomi, L., Giavini, E., Leone, V.G., Mariani, L., 1979. The extend of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology*. 20, 237-242.
- Arthur, G.H., 1979. *Reprodução e Obstetrícia Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 85-113.
- Barrow, M.V., Taylor, W.I., 1969. A rapid method for detecting malformation in rat fetuses. *J Morphol*. 127, 291-306.
- Chahoud, I. et al., 1999. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation. *Reprod Toxicol*. 13 (1), 77-82.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L., 1996. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 834-891.
- Hnatyszyn, O., Moscatelli, V., Garcia, J., Rondina, R., Costa, M., Arranz, C., Balaszczuk, A., Ferraro, G., Coussio, J.D., 2003. Argentinian plant extract with relaxant effect on the smooth muscle of the *corpus cavernosum* of Guinea pig. *Phytomedicine*. 10, 669-674.
- Hyttén, F.E., 1984. Physiological changes in the mother related to drug handling. In: Krauer, B. (Eds.), *Drugs and Pregnancy*, New York, Academic Press, p. 7.
- Ishikawa, H., Seki, R., Yokonishi, S., Yamauchi, T., Yokoyama, K., 2006. relationship between fetal weight, placental growth and litter size in mice from mid- to late-gestation. *Reprod Toxicol*. 21, 267-270.
- Jackson, P.G.G., 2005. *Obstetrícia Veterinária*. ROCA, São Paulo, pp. 17-27.
- Kato, H., Morishige W.K., Rotchild, I., 1979. A quantitative relationship between the experimentally determined number of conceptuses and corpus luteus activity in pregnant rats. *Endocrinology*. 105, 846-850.
- Khera, K.S., 1984. Maternal toxicity – a possible factor in fetal malformations in mice. *Teratology*. 29, 411-416.
- Khera, K.S., 1985. Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratology*. 31, 129-153.
- Manson, J.M., Kang, Y.J., 1989. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes, A.W. (Eds.) *Principles and methods of toxicology*, Raven Press, New York, pp. 311-359.
- Moore, K.L., Persaud, T.V.N., 2004. *Embriologia Clínica*. Elsevier, Rio de Janeiro, 609p.
- National Research Council., 1996. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academy Press, Washington, 140p.
- Neroli, A.N., Neville, W.B., 1979. Fetal and placental weight relationships in the albino rat near term. *Teratology*. 19, 245-250.
- Nunes, G.P., Silva, M.F., Resende, U.M., Siqueira, J.M., 2003. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev Bras Farmacogn*. 13 (2), 83-92.
- Sadler, T.W., 2005. *Langman Embriologia Médica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 347p.
- Simões, C.M.O., Mentz, L.A., Schenkel, E.P., Irgang, B.E., Stehmann, J.R., 1998. *Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul*. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 173p.
- Solecki, R. et al., 2001. Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. Report of the third Workshop on the terminology in developmental toxicology, Berlin, 14-16 September 2000. *Reprod Toxicol*. 15, 713-721.
- Solecki, R. et al., 2003. Harmonisation of rat fetal external and visceral terminology and classification. Report of the fourth Workshop on the terminology in developmental toxicology, Berlin, 18-20 April 2002. *Reprod Toxicol*. 17, 625-637.

- Staples, R.E., Schnell, V.L., 1964. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol.* 39, 61-63.
- Taylor, P., 1986. *Practical Teratology*. New York: Academic Press, 171p.
- Torres, L.M., Gamberini, M.T., Roque, N.F., Landman, M.T., Souccar, C., Lapa, A.J., 2000. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*. 55, 617-619.
- Uchida, K., Kadowari, M., Nomura, Y., Miyata, K., Miyak, T., 1970. Relationship between ovarian progestin secretion and corpora lutea function in pregnant rat. *Endocrinol Jpn.* 17, 499-507.
- Wilson, J.G., 1965. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: Wilson, J.G., Warkany, J. (Eds.), *Teratology: principles and techniques*. University of Chicago Press, Chicago, p. 262-277.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a metodologia utilizada neste trabalho, conclui-se que o extrato hidroetanólico de *B. trimera*, na concentração de 8,4mg/kg, é hepato e nefrotóxico para ratas gestantes, sendo a severidade das alterações diretamente relacionada com o tempo de exposição ao agente tóxico.

Na prole das ratas expostas ao extrato hidroetanólico de *B. trimera*, durante toda gestação, há aumento na ocorrência de malformações viscerais e variações esqueléticas, redução do peso e do tamanho fetal e da ossificação. Apesar disso, essas alterações possivelmente não sejam efeito direto do extrato, e sim consequência da toxicidade materna induzida pelo mesmo.

Além disso, o aumento significativo em qualquer das quatro manifestações de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal (morte, alterações no crescimento, anormalidades estruturais e alterações funcionais nos órgãos fetais) deve ser considerado um indicativo de toxicidade importante, mesmo que seja secundária à toxicidade materna.

Sendo assim, é adequado considerar a possibilidade de extrapolar os resultados obtidos neste trabalho com ratos para a espécie humana, pois os efeitos adversos maternos e fetais observados foram detectados a partir da utilização do extrato hidroetanólico de *B. trimera* na mesma dose e na mesma via de administração as quais a população humana está exposta comumente, fator que está associado à identificação do risco para humanos.

Deve-se considerar ainda, a possibilidade de extrapolar para humanos que a ocorrência de neonatos apresentando retardo no crescimento intra-uterino pode estar associada à utilização materna de *B. trimera*, durante a gestação.

ANEXOS

ANEXO 1 (Artigo 1) – Manuscript Submission for JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs
The Official Journal of the [International Society of Ethnopharmacology](#)

Guide for Authors

I. Scope of the journal

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

In recent years the preservation of local knowledge, the promotion of indigenous medical systems in primary health care, and the conservation of biodiversity have become even more of a concern to all scientists working at the interface of social and natural sciences but especially to ethnopharmacologists. Recognizing the sovereign rights of States over their natural resources, ethnopharmacologists are particularly concerned with local people's rights to further use and develop their autochthonous resources.

Accordingly, today's Ethnopharmacological research embraces the multidisciplinary effort in the documentation of indigenous medical knowledge, scientific study of indigenous medicines in order to contribute in the long-run to improved health care in the regions of study, as well as search for pharmacologically unique principles from existing indigenous remedies.

The *Journal of Ethnopharmacology* publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an **ethnopharmacological**, an **ethnobotanical** or an **ethnochemical** approach to the study of indigenous drugs. Reports of **anthropological** and **ethnobotanical** field studies fall within the journal's scope. Studies involving **pharmacological** and **toxicological** mechanisms of action are especially welcome. **Clinical studies** on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems.

The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only. All reviews and commentaries are fully peer-reviewed. Potential authors are strongly encouraged to contact the Reviews Editor jethnopharmacol@pharmacy.ac.uk prior to writing a review. A one-page outline and a short C.V. of the (senior) author should also be included.

THE "RULES OF 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here.](#)

II. Preparation of manuscripts

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

Contributions are accepted on the understanding that the authors have obtained the necessary authority for publication. Submission of multi-authored manuscripts implies the consent of each of the authors. The publisher will assume that the senior or corresponding author has specifically obtained the approval of all other co-authors to submit the article to this journal. Submission of an article is understood to imply that it is not being considered for publication elsewhere and that the author(s) permission to publish his/her article in this journal implies the exclusive authorization to the publisher to deal with all issues concerning copyright therein. Further information on copyright can be found on the Elsevier website.

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

1. Manuscript types

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions,

Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations

2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors;
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome.
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.
7. Conference announcements and news.

2. General procedures

The language of the Journal is English. Manuscripts should be neatly typed, double-spaced throughout, including tables, on pages of uniform size with at least 2.5 cm margins on all sides. Use one font type and size throughout the manuscript. Author(s) should not break or hyphenate words. When using an electronic printer, the right-hand margin should not be justified. Footnotes in text are not permitted. The text of the manuscript must be paginated, the first page being the title page. The manuscript, typed with double spacing and ample margins, should be submitted with a cover letter (containing the declaration that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights and a clear explanation of the ethnopharmacological importance of the study) and a completed Author Checklist ([click here](#)).

The following format and order of presentation is suggested.

2.1. Title, author(s), address(es)

The title should be no longer than 100 letters, including spaces. Initials or first and middle names followed by last name of the author or authors must be given (**not** last name followed

by initials). If there are two or more authors with different addresses, use a superscripted letter (a, b, c etc.), not a number, at the end of the last name of each author to indicate his/her corresponding address. The full address of the corresponding author (the way the author wishes to be contacted) should be provided. The corresponding (usually, the senior) author, to whom correspondence and proofs will be sent, must be indicated by an asterisk and footnoted, and in the footnote, his/her telephone and fax numbers, and e-mail address must be indicated. Address(es) should be underlined or italicised.

2.2. Abstract

The abstract should present a summary of the problem, scientific method, major findings and conclusions, in no more than 200 words and in one paragraph and presented at the beginning of the paper. Unsubstantiated speculation should not be included. Footnotes may not be used. References, if cited, must provide complete publication data.

2.3. Text layout

The text of a research paper should be divided into the following headings: Introduction, Methodology (or Materials and Methods), Results, and Discussion and conclusions. Each heading (and subheading) must be numbered using the convention established in the journal. Acknowledgements should come after Discussion and conclusions and before References; Acknowledgements and References are not to be numbered. Headings must be bold-faced and written in an upper-and-lower case style [not in caps], while subheadings should be underlined or italicised. Tables and figures are to be placed at the end of the text, after References. Authors are required to include: (i) the chemical structure, formula and proprietary name of novel or ill-defined compounds; (ii) the w/w yield of prepared extracts in terms of starting crude material; (iii) complete formulation details of all crude drug mixtures; (iv) the voucher herbarium specimen number of the plant(s) studied in case of less well known plants, cited using the collector and collection number (e.g., *Doe 123*), and indicating the name of the herbarium institution where it has been deposited. All plant materials must be fully identified as in the following illustration: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don f. *albus* Pich. (Apocynaceae) as authenticated by Dr. John Doe, Department of Botany, University of Connecticut.

2.4. Guidelines for Plant and Animal Names

All scientific names (Latin binomials) must be underlined or italicised throughout the text and in the tables and figures. For plant and animal species, full or complete scientific names, genus-species and the correct authority citation, must be used, *when that name appears for the first time in text*. The authority citation may be dropped in subsequent mention of that name throughout the text. The family name must follow the scientific name in parentheses when the name appears for the first time in the text. Full scientific names and the family name of the subject plants/animals must be used in the Abstract. Synonyms must be indicated in parentheses and preceded by the word "syn." followed by a colon. Authors are advised to consult the International Plant Name Index (IPNI) (⇒ <http://www.ipni.org>) and W3Tropicos (⇒ <http://www.mobot.org>) web-based databases to determine the correct spelling of full plant scientific names. Generic names may be abbreviated (e.g., *C. roseus* for *Catharanthus roseus*), provided such practice does not lead to confusion; generic names, however, must not be abbreviated when the name appears for the first time in the text. Specific epithets must never be abbreviated; thus, the use of *Catharanthus r.* is not allowed.

2.5. Keywords

Authors are requested to assign 3-6 keywords to the manuscript, preferably taken from Index Medicus or Excerpta Medica Index, for abstracting and indexing purposes. These keywords should be typed at the end of the Abstract. Each keyword should start with a capital letter and be separated from each other by a semi-colon.

2.6. Tables, illustrations and graphs

Tables should be on separate sheets, one table per sheet, and should bear a short descriptive title. Footnotes in tables should be indicated by consecutive superscript letters, not numbers.

Figures should be original ink drawings, photographs or computer drawn figures in the original, and of high quality, ready for direct reproduction. Xerox copies are unacceptable as they give unsatisfactory results after final printing. Figures should be drawn in such a way that they can be reduced to **8 cm** in width (i.e., the column width); in exceptional cases a reduction to a width of **17.5 cm** will be allowed. All lettering should be such that height of **1.2-1.5mm (minimum)** of numbers and capital letters results after reduction. Numerical scales, scale and curve legends, and all other lettering within the figure itself should be drawn with a lettering guide (stencil) or should be done using stripleters (Letraset, etc). All figures should have captions. Each figure should be identified in the margin or at the back in a corner with the name of the author and the figure number. The figure captions should be on a separate sheet. One set of original drawings is required.

Colour illustrations should be submitted as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Polaroid colour prints are not suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the total cost from Elsevier after receipt of your accepted article. The 2006 price for color figures is EUR 285 for the first page and EUR 191 for subsequent pages.

For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

2.7. References

References should be referred to by name and year (Harvard system) chronologically in the text (e.g.: Brown and Penry, 1973; Stuart, 1979; Ageel et al., 1987) and listed alphabetically at the end of the paper. No ampersand should be used and the words "et al." should not be underlined or italicized. Only papers and books that have been published or in press may be cited.

For papers in press, please cite the DOI article identifier. The Digital Object Identifier (DOI)

is a persistent identifier which may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The DOI will never change. Therefore, it is an ideal medium for citing Articles in Press, which have not yet received their full bibliographic information. *Unpublished manuscripts or manuscripts submitted to a journal but which have not been accepted may not be cited.* Journal and book titles should not be underlined or italicised and should be given in full in the reference list, with no underline or italics.

Examples:

Journals:

Britton, E.B., 1984. A pointer to a new hallucinogen of insect origin. *Journal of Ethnopharmacology* 12, 331-333.

Books: Emboden, W., 1972. *Narcotic Plants*. Studio Vista, London, p. 24.

Multiauthor Books:

Farnsworth, N.R., 1988. Screening plants for new medicines. In: E.O. Wilson and F.M. Peter (Eds.), *Biodiversity*, National Academy Press, Washington, D.C., pp. 83-97.

Ethnopharmacological Communications (formerly short communications) are brief contributions on:

- isolation of biological active compound(s) from a traditional medicine,
- screening of a series traditional medicines for biological activity,
- study on a pharmacological activity of a traditional medicine,
- study on the toxicology of a traditional medicine.

[\(click here\)](#) for examples of various formats.

III. Submission

All manuscripts (except reviews, commentaries and book reviews) must be submitted to <http://authors.elsevier.com/journal/jethpharm>

Each Submission must include a cover letter (containing the declaration that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights and a clear explanation of the ethnopharmacological importance of the study) and a completed Author Checklist ([click here](#)).

If an author cannot submit their manuscript electronically, then please send to:

Professor Dr R. Verpoorte
 Editor-in-Chief, *Journal of Ethnopharmacology*
 Division of Pharmacognosy
 Institute of Biology
 Leiden University
 P.O. Box 9502
 2300 RA Leiden
 The Netherlands

IV. Copyright regulations for authors

All authors must sign the "Transfer of Copyright" agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microform, or any other reproductions of similar nature and translations, and includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation into retrieval systems. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists. Transfer of copyright agreement forms will be sent to the corresponding author following acceptance of the manuscript.

V. Retained authors' rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on <http://www.elsevier.com>)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

VI. Correcting proofs and reprints

Proofs will be sent to the corresponding author. Elsevier is now sending PDF proofs by e-mail for correction. If an author is unable to handle this process, regular print proofs will be sent. Elsevier will do everything possible to get the article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all corrections are sent back in ONE communication. Subsequent corrections will not be possible. Only typesetting errors

may be corrected; no changes in, or additions to, the accepted manuscript will be allowed. Proofs should be returned to Elsevier within 48 hours. Twenty-five offprints of each paper will be supplied free of charge to the corresponding author. Additional offprints can be ordered at prices shown on the offprint order form that accompanies the copyright form.

VII. Language Polishing

For authors, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our [Terms & Conditions](#).

VIII. US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

IX. Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit Elsevier's Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>. The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when the article status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

No responsibility is assumed by the Publisher for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions or ideas contained in the material herein. Because of the rapid advances made in the medical sciences, independent verification of diagnoses and drug dosages should be made.

ANEXO 2 (Artigo 2) – Manuscript Submission for TOXICOLOGY LETTERS

Official Journal of [EUROTOX](#)

An international journal for the rapid publication of short reports on all aspects of toxicology, especially mechanisms of toxicity

Guide for Authors

An international journal for the rapid publication of short reports on all aspects of toxicology, especially mechanisms of toxicity. *Toxicology Letters* also publishes mini-reviews, editorials, commentaries and contemporary issues in toxicology.

General guidelines

The journal focuses on the rapid publication of novel results and prefers short manuscripts on all aspects of toxicology although longer manuscripts will be considered. Preference is given to studies that are relevant to mechanistic toxicology and hypothesis-driven. The rationale should be sound, and the experimental design should be well-conceived. Completeness usually requires that dose-response relationships are examined. Manuscripts that primarily describe new methods, either experimental or theoretical, should provide examples of their use. When studies involve the use of experimental animals, manuscripts should briefly describe the procedures employed for animal care and handling. Experiments that require the use of animals or humans must be conducted in accordance with International Guidelines.

Non-hypothesis-driven studies (e.g. safety evaluation of new chemicals or drugs) may be published if the work is considered complete and the conclusions are unequivocal. Studies that fail to elicit a toxic response (negative studies) might be acceptable if competently performed.

A manuscript may be declined for reasons of ethical considerations, incompleteness, insufficient quality, prior publication of portions of the work, inadequate experimental design or methods, inadequate description of experiments, of insufficient support for conclusions, or subject matter not consistent with the mission of the journal.

Manuscripts are accepted for review with the understanding that the same work has not been published, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out. Further, it is understood that any person cited as a source of personal communications has approved such citation.

Authors submitting a manuscript do so on the understanding that if it is accepted for publication, copyright in the article, including the right to reproduce the article in all forms and media, shall be assigned exclusively to Elsevier, unless legally prohibited (e.g. U.S. Federal government employees).

Conflict of Interest and Source of Funding. A conflict of interest exists when an author or the author's institution has a financial or other relationship with other people or organizations that may inappropriately influence the author's actions. All submissions to *Toxicology Letters* must include disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. *Toxicology Letters* may use such information as a basis for editorial decisions and may publish such disclosures if they are believed to be important to readers in

judging the article.

Conflict of Interest Statements for Authors. At the end of the text, under a subheading "Conflict of Interest Statement", all authors must disclose any financial, personal, or their relationships with other people or organizations within 3 years of beginning the work submitted that could inappropriately influence the work submitted. Examples of conflicts include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none. Investigators should disclose potential conflicts to participants in clinical trials and other studies and should state in the manuscript whether they have done so. *Toxicology Letters* may decide not to publish on the basis of a declared conflict, such as the financial interest of an author in a company (or its competitors) that makes a product discussed in the paper.

Role of the Funding Source. All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text. Authors must also describe the role of the study sponsor(s), if any, in a study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the study sponsor(s) had no such involvement, the authors should so state.

Manuscripts

Manuscripts should be typewritten, 1.5-spaced and should be in English. References should be single spaced. In general, manuscripts should not be longer than 10 printed pages (approx. 15, 1.5-spaced typewritten pages) including the space needed for illustrations.

Manuscripts must be submitted for review via the Internet through the Author Gateway on the Elsevier website (<http://ees.elsevier.com/>) toxlet). Submissions that are emailed, or mailed, to the editors will not be considered. Questions about submissions may be directed to the appropriate editor.

Americas and Japan: kehrerjim@mail.utexas.edu

All other areas of the world: dekant@toxi.uni-wuerzburg.de

English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Mini-review papers

These papers should be approximately 12-15, 1.5-spaced typewritten pages; should be in English and submitted via the Internet through the Author Gateway on the Elsevier website (<http://ees.elsevier.com/toxlet>). The reference list need not be exhaustive, but should include the most significant articles. The names of two potential reviewers are also requested.

Revised versions

The medium of submission for revised papers is electronically through the Author Gateway on the Elsevier website (<http://ees.elsevier.com/>). Figures should be submitted as original high quality files of a standard graphics program. Revised versions should be returned within 3

months of the first date of decision. Failure to do so may result in any resubmission being treated as a new version and carrying a new date of receipt.

Address

Authors' full names, academic or professional affiliations and addresses should be included on the first page. The name and complete address and e-mail address of the author to whom any correspondence is to be sent should be given.

Key words

A list of 3-6 words or short phrases suitable for use in Index should be included on the first page. These terms will be printed with the paper below the Abstract. In the event that key words are not supplied editorial discretion will be exercised in introducing appropriate words.

Abstract

The article should start with an Abstract of about 150 - 200 words.

Figures

Figures should be provided as high quality electronic files using standard software. Color should only be used when scientifically necessary. The cost of publishing in color is 350 Euro for the first page, 175 Euro for each subsequent page.

Tables

Tables should be numbered with Arabic numbers and bear a short descriptive title. Each table should be typed on a separate sheet.

Gene accession numbers

In the electronic version of a published manuscript, gene accession numbers will be linked directly to the gene's description in NCBI's Nucleotide sequence database. The accession number should be formatted as follows:

Accession no. AJ315850

The production department will then link this reference when they find it in the text. Authors should DOUBLE-CHECK the number they use to make absolutely sure that it is correct before referring to it in their paper. Accession numbers in proofs should also always be checked for correctness. The number is an essential part of the link.

References

References should be typed on a separate sheet of paper. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names, and chronologically per author. In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication. Literature references must consist of names and initials of all authors, year, title of paper, abbreviated title of periodical and the volume, and first and last page numbers of the paper. References should be limited to 50 or

less.

'Unpublished results' and 'personal communication' should not be included in the reference list as they are of little use to the reader but they may be cited as such in the text. The abbreviation of journal titles should conform to those adopted by List of Serial Title Work Abbreviations (International Serials Data System, International Organization for Standardization, 20, rue Bachaumont, 75002 Paris, France, ISBN 2-904938-02-8). In the reference list, periodicals, books, and edited books should accord with the following examples:

Hancock, K., Tsang, V.C.W., 1983. India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* 133, 157-162.

Metcalf, D., 1984. *The Hemopoietic Colony Stimulating Factors*. Elsevier, Amsterdam, pp. 173-185.

Hamor, T.A., Martin, I.L., 1983. The benzodiazepines. In: Ellis, G.P., West, G.B. (Eds.), *Progress in Medicinal Chemistry*, col. 20. Elsevier, Amsterdam, pp. 157-223.

Proof reading

Proofs will be supplied electronically for the author to check for typesetting accuracy. Only printer's errors may be corrected; no changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

Inquiries regarding accepted manuscripts should be addressed to: *Toxicology Letters*, Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Bookvale Plaza, East Plaza, Bay 15, Shannon Industrial Estate, Shannon, Co. Clare, Ireland. Tel.: (+353-61)709600; Fax: (+353-61)709109.

Reprints

A total of 25 reprints of each paper will be provided free of charge. Additional copies may be ordered at prices shown on the reprint order form which will be sent to the author.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy
Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Preparation of supplementary material

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sounds clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect

(<http://www.sciencedirect.com>). In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Files can be stored on 3 inch diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh). Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>. *Toxicology Letters* has no page charges.