

Desenvolvimento Pós-natal da Prole exposta ao Extrato Hidroalcoólico da *Cissampelos sympodialis* Eichl., durante o Período Gestacional de Ratas

Flavia Negromonte Souto MAIOR, Jullyana de Souza SIQUEIRA, Marília Denise de Saraiva BARBOSA & Reinaldo Nóbrega de ALMEIDA*

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba. Caixa postal 5009, CEP 58051-970, João Pessoa, Paraíba-PB, BRASIL.

RESUMO. Neste trabalho foram investigados os possíveis efeitos tóxicos no desenvolvimento da prole, decorrentes do tratamento de ratas prenhes com o extrato hidroalcoólico das folhas da *Cissampelos sympodialis* Eichl. Foram registrados: duração da gestação; ganho de peso da mãe; número de filhotes por ninhada; peso dos filhotes; reflexo de endireitamento; dia de abertura dos olhos; dia de andar adulto e ocorrência de malformações. Os resultados sugerem a ausência de efeitos adversos desta planta durante a gestação. Testes complementares deverão ser realizados, visando dar maior suporte à realização dos estudos clínicos.

SUMMARY. "Postnatal development of offsprings exposed to hydro alcoholic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl., during the pregnancy". In the present study, possible toxic effects on development of the offsprings were investigated after the treatment of pregnant female rats with the hydroalcoholic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaves. The following parameters were analyzed: pregnancy duration; weight gain; litter size; body weight of the pups; righting reflex; eye opening; hind paws supporting and body lifting; external malformations occurrence. The results suggest the absence of side effects of this plant during pregnancy. Other tests should be carried out to give further support to clinical studies.

INTRODUÇÃO

A *Cissampelos sympodialis* Eichl. (*Menispermaceae*), planta usada popularmente no tratamento de asma, bronquite, artrite e infecções urinárias¹, vem sendo estudada pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), há alguns anos, do ponto de vista químico, farmacológico e toxicológico, na perspectiva do desenvolvimento de um medicamento fitoterápico. Um estudo toxicológico complementar foi então realizado no LTF/UFPB, visando investigar possíveis efeitos tóxicos no desenvolvimento da prole nascida de ratas prenhes tratadas com a fração aquosa do extrato hidroalcoólico das folhas da *C. sympodialis*².

De acordo com a legislação vigente no Brasil, dentre os testes toxicológicos complementares, deverá ser feita a determinação de efeitos

adversos sobre a mãe e o produto, durante os últimos estágios da prenhez, parto e desenvolvimento pós-natal, por drogas administradas durante este período, em uma espécie de mamífero³. A importância deste estudo é de possibilitar novas informações sobre o uso da *C. sympodialis* que poderão ser úteis à população, e procurar garantir a segurança no uso desta planta ou do seu futuro fitoterápico durante a fase de gestação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

No início dos experimentos foram utilizados ratos Wistar, adultos, machos pesando de 250-350 g e, fêmeas, virgens, pensando entre 180-200 g, provenientes do biotério do LTF/UFPB. Esses animais foram mantidos à temperatura de aproximadamente 27 ± 2 °C, umidade relativa

PALAVRAS CHAVE: *Cissampelos sympodialis*, Desenvolvimento, Toxicidade.

KEY WORDS: *Cissampelos sympodialis*, Development, Toxicity.

* Autor a quem dirigir a correspondência: E-mail: reinaldo@lft.ufpb.br, reinaldoan@uol.com.br

de aproximadamente 60%, ciclo claro-escuro de 12 h, recebendo água e ração à vontade. Os animais eram transferidos para a sala de testes, uma hora antes dos experimentos. Todos os testes foram realizados no turno da manhã, das 8:00 às 12:00 horas.

Planta

Foram utilizadas as folhas frescas da *C. sympodialis*, provenientes do Horto de Plantas Medicinais do LTF/UFPB onde foram previamente identificadas. A exsicata da planta pode ser encontrada no Herbário do Departamento de Botânica da UFPB, sob o código: Agra 1456.

Preparação do Extrato Hidroalcoólico Bruto e Fração Aquosa das Folhas da *C. sympodialis*

As folhas frescas da *C. sympodialis* foram secadas em estufa e trituradas. A seguir, foram submetidas a um processo de extração por maceração com 70% de etanol em água e concentradas em rotavapor até a obtenção do extrato hidroalcoólico bruto (com aproximadamente 22% de rendimento), que foi mantido em dessecador sob refrigeração até o seu uso.

Para obtenção da fração aquosa (FAF), o extrato hidroalcoólico seco foi dissolvido em água, filtrado e o volume conhecido foi desidratado para determinar a concentração final da fração aquosa das folhas (70%). Antecedendo os tratamentos, a FAF era preparada em quantidades suficientes para administração em no máximo 24 h.

Determinação das doses da *C. sympodialis* utilizadas nos experimentos

Um estudo anteriormente realizado determinou, a partir de cálculos baseados em informações sobre o uso popular da *C. sympodialis*, que a dose terapêutica humana de preparações com essa planta é de aproximadamente 9,0 mg/kg/dia⁴. Em nossa pesquisa as doses foram determinadas através de cálculos de progressão geométrica, baseados na portaria Nº 116/96 da SVS. Foram então utilizadas as doses de 9,0 mg/kg (uso popular), 45,0 mg/kg (cinco vezes a dose de uso popular) e 225,0 mg/kg (25 vezes a dose de uso popular), administradas por via oral (v.o.).

Tratamento das ratas prenhes

O grupo controle foi tratado, por gavagem, com o veículo (água destilada 0,1 ml/100 g de

peso animal) durante todos os dias da gestação. Os grupos experimentais **M1**, **M2** e **M3** foram tratados com a FAF, com as respectivas doses de 9,0, 45,0 e 225,0 mg/kg (v.o.), durante todos os dias da gestação.

Efeitos sobre a fertilidade das ratas

Após o acasalamento dos animais, foram realizados esfregaços vaginais diários, até detectar a presença de espermatozóides. Tal dia era considerado o 1º dia de prenhez. As fêmeas prenhes foram distribuídas aleatoriamente em grupos controle e experimentais, contendo, em cada grupo, um total de seis animais⁵⁻⁷.

No 22º dia de prenhez as ratas foram pesadas e colocadas em caixas individuais, para aguardar o nascimento dos filhotes. Foram registrados os seguintes parâmetros: a duração da gestação, o ganho de peso da mãe e o número de filhotes em cada ninhada. Padronizou-se, quando possível, um número de seis filhotes por ninhada, sendo três machos e três fêmeas^{8,9}.

Efeitos sobre o desenvolvimento da prole

Para acompanhar o desenvolvimento dos filhotes, foram observados os seguintes aspectos: **peso dos filhotes**: no 1º, 7º, 14º e 21º dia após o nascimento; **reflexo postural**: no 1º, 3º e 7º dia pós-nascimento, onde cada filhote era colocado sobre uma superfície plana em decúbito dorsal e medido, em segundos, o reflexo de endireitamento; **dia de abertura dos olhos**: observado a partir do 7º dia do nascimento, sendo considerada, a abertura, o deslocamento parcial da fissura palpebral em pelo menos um olho; **dia de andar adulto**: observado a partir do 8º dia do nascimento, sendo o dia em que o filhote ambulava sem arrastar as patas traseiras e sem encostar o ventre no chão; **ocorrência de malformações**: ao nascimento e durante o desenvolvimento dos filhotes, quando foram examinados para investigar a possível presença de malformações, visíveis à simples inspeção¹⁰.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Dunnett, ou teste de Tukey com múltiplas comparações. As análises estatísticas não-paramétricas foram realizadas pelo teste de kruskal-Wallis, seguido do Teste de Dunn. Os gráficos foram construídos utilizando programa GraphPad Prism.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A exposição materna a vários xenobióticos durante a gestação pode causar neurotoxicidade no desenvolvimento e/ou ainda anormalidades no comportamento dos recém-nascidos que podem persistir durante toda a sua vida ^{11,12}, pois o SNC durante o seu desenvolvimento pode ser especialmente susceptível aos efeitos tóxicos dos xenobióticos ^{13,14}. Pode-se tomar como exemplo de substância neurotóxica a heroína, agente comprovadamente anorexígeno que, em um estudo experimental, diminuiu a ingestão maternal de alimento, o consumo de água e o ganho de peso de ratas prenhes e, também, o peso dos filhotes ao nascimento sem, entretanto afetar o tempo de duração da gestação ¹⁵. Durante os nossos experimentos, o tempo de gestação, o ganho de peso das mães e o número de filhotes presente em cada ninhada, mostrados na Tabela 1, não apresentaram valores estatisticamente significativos, quando comparados aos do grupo controle, o que pode indicar que o tratamento com o extrato da *C. sympodialis* não exerça efeitos prejudiciais sobre a fertilidade das ratas.

Muitos estudos vêm sendo realizados nas áreas de fertilidade e teratogenicidade. Numa avaliação teratogênica em ratos realizada com o extrato aquoso das sementes da *Butea monoperma*, no caso onde a prenhez foi mantida, ocorreram diversas malformações como caudas defeituosas, fendas palatinas e costelas não ossificadas ¹⁶. Em nossa pesquisa, a prole resultante das ratas tratadas com a FAF, em todos os grupos (M1, M2 e M3), não apresentou, ao nascimento e durante o desenvolvimento, malfor-

mações ou anomalias estruturais externas perceptíveis à simples inspeção (dado não mostrado). Assim, é possível imaginar que a *C. sympodialis* não causa malformações, o que parece ser mais um ponto positivo ao desenvolvimento do fitoterápico. Contudo, alguns testes histológicos deverão ser realizados, verificando, microscopicamente, a constituição dos órgãos torácicos e abdominais, bem como as alterações ósseas dos fetos retirados por cesariana.

O dia de abertura dos olhos, considerado um parâmetro fisiológico, e o dia de andar adulto representam uma fase marcante no desenvolvimento físico dos animais ¹⁷. No nosso trabalho com a *C. sympodialis*, os valores dos grupos experimentais apresentados, na Tabela 2, não foram estatisticamente significativos em relação ao controle, quanto ao dia de abertura dos olhos e do andar adulto, o que nos levou a crer que a administração da FAF, durante o período de gestação das ratas, não causa atrasos na maturação física e no desenvolvimento dos filhotes. Diversas outras investigações têm sido desenvolvidas no sentido de observar a interferência de fatores diversos sobre estes parâmetros em estudo, a exemplo do trabalho onde foi observado que a exposição de ratas prenhes ao bromatam, substância largamente utilizada por atletas para acentuar o desempenho muscular, acelera o processo de abertura dos olhos da prole sem, no entanto, interferir no dia de andar adulto dos grupos experimentais ¹⁸.

No estudo da *C. sympodialis*, a exposição pré-natal à FAF não parece interferir sobre o ganho de peso dos filhotes em desenvolvimento, pois, ocorreu um aumento progressivo do

PARÂMETRO AVALIADO	CONTROLE	M1	M2	M3
Duração da Gestação (Dias)	23,0 ± 0,0	22,8 ± 0,2	22,7 ± 0,2	22,6 ± 0,2
Ganho de Peso da Mãe (g)	92,0 ± 10,9	79,0 ± 11,1	92,5 ± 8,8	83,6 ± 10,4
Número de Filhotes por Ninhada	8,5 ± 1,0	7,2 ± 2,4	8,8 ± 1,2	10,0 ± 1,0

Tabela 1. Efeito do tratamento com a FAF sobre a fertilidade das ratas. ANOVA de uma via/Teste de Dunnett (média (EP, n = 6 animais).

PARÂMETRO AVALIADO	CONTROLE	M1	M2	M3
Dia de Abertura dos Olhos	15,2 ± 0,2	14,6 ± 0,3	15,3 ± 0,1	15,3 ± 0,1
Dia de Andar Adulto	14,1 ± 0,1	14,2 ± 0,1	14,3 ± 0,1	14,5 ± 0,1

Tabela 2. Efeito do tratamento com a FAF sobre abertura de olhos e andar adulto dos filhotes. Teste de Kruskal-Wallis/Teste de Dunn (média ± EP, n = 24 animais).

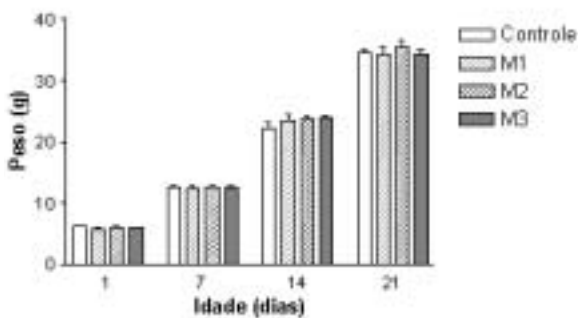


Figura 1. Efeito do tratamento com a FAF sobre o peso dos filhotes. ANOVA de uma via/Teste de Tukey (média (EP, n = 24 animais).

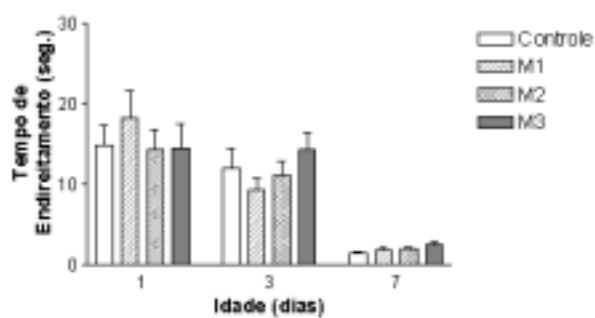


Figura 2. Efeito do tratamento com a FAF sobre o Reflexo Postural dos Filhotes. ANOVA de uma via/Teste de Tukey (média ± EP, n = 24 animais).

peso durante a fase observada, porém não significativo em relação ao controle (Figura 1). Em estudo semelhante realizado com a *Maytenus ilicifolia* houve uma diminuição estatisticamente significativa do peso dos filhotes das ratas tratadas com a maior dose, na ocasião do nascimento. Entretanto, esta diferença de peso não se manteve no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia após o nascimento¹⁰.

Em nossa *pesquisa*, o efeito do tratamento com a FAF em ratas prenhes sobre o reflexo postural dos filhotes dos grupos M1, M2 e M3 não foi estatisticamente significativo ($P > 0,05$), tanto quando comparados com o grupo controle (Figura 2). O reflexo medular de endireitamento é um dentre vários reflexos relativamente complexos que estão associados à postura, os quais são parcialmente integrados na medula. A substância cinzenta da medula é uma zona de integração para os reflexos medulares e outras funções motoras¹⁹. O reflexo postural é considerado pleno quando o animal retorna imediatamente à sua posição normal sobre as quatro patas¹⁸. Em nossos estudos, os animais provavelmente atingiram a completa maturação das referidas estruturas envolvidas com as funções motoras de reflexo medular, a partir deste sétimo dia. Ao investigar dos efeitos da exposição pós-natal de ratas ao amitraz, diferenças significativas foram observadas entre os grupos controle e experimental sobre o reflexo postural

dos filhotes no terceiro e quarto dia após o nascimento⁸. Um estudo foi realizado sobre a exposição ao ácido retinóico durante o período gestacional, onde o tratamento com esta droga durante os dias 11 a 13 do período gestacional de ratas prejudicou significativamente o reflexo de endireitamento dos filhotes, nas duas linhagens testadas, quando comparado aos grupos controle²⁰.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste estudo pré-clínico confirmam a segurança do uso da *C. sympodialis*, em doses terapêuticas, por via oral, durante todo o período gestacional de ratas. Contudo, testes complementares deverão ser realizados, enfocando principalmente, investigações de embrião e fetotoxicidade, visando dar maior suporte para a realização dos estudos clínicos. Com base na legislação vigente, os estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos realizados com a *C. sympodialis* servirão como etapa para a futura regulamentação desta planta como um medicamento fitoterápico novo, o qual poderá servir de referência para similares.

Agradecimentos. Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq pelo suporte financeiro durante os estudos e a José Crispim Duarte pelo apoio Técnico.

REFERÊNCIAS

1. Corrêa, M.P. (1929) "*Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*". V. 5. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, pp. 320.
2. Souto Maior, F. N. (2002) "Efeito do tratamento com o extrato hidroalcoólico da *Cissampelos sympodialis* Eichl., durante a prenhez de ratas, sobre o desenvolvimento e comportamento da prole". Dissertação de Mestrado (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba), Paraíba, Brasil.
3. Site: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (on-line) - "Resolução - RDC Nº 17, de 24 de fevereiro de 2000". Disponível: <http://www.

- anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc. htm> Acesso em: 22 mai. 2003.
4. Diniz, M. de F.F.M (2000) 'Ensaio toxicológicos pré-clínicos com as folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae)'. Tese de Doutorado (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba), Paraíba, Brasil.
 5. Goonasekera, M.M., V.K. Gunawardana, K. Jayasena, S.G. Mohammed & S. Balasubramaniam (1995) *J. Ethnopharmacol.* **47**: 117-23.
 6. Almeida, E.R. de, A.C. de Mello, C.F. de Santana, A.A. da Silva-Filho, & E. R. dos Santos (1998) *Rev. Port. Farm.* **38**: 21-3.
 7. Almeida, E.R. de, A.M. Melo & H. Xavier (2000) *Phytother. Res.* **14**: 99-102.
 8. Palermo-Neto, J., M. Sakaté & J.C. Flório (1997) *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **30**: 989-97.
 9. Da-Silva, V.A., S.P. Altenburg, L.R. Malheiros, T.G. Thomaz & C.J. Lindsey (1999) *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **32**: 93-8.
 10. Carlini, E.A., C.I.P. Macaubas, MN.G.M. de Oliveira & V.P. Barbosa (1988) "Toxicologia pré-clínica da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*)" In: "Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* Espinheira Santa e outras)" Brasília: CEME/AFIP, pp. 49-66.
 11. Castro, V.L. & J. Palermo-Neto. (1988) *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **21**: 987-90.
 12. Castro, V.L., M.M. Bernardi & J. Palermo-Neto (1989) *Arch. Toxicol.* **66**: 149-52.
 13. Gray Jr, L., R. Kavlock Jr, N. Chemoff, J. Gray & J. Mclamb (1981) *Toxicol.* **21**: 187-202.
 14. Winneke, G. (1992) *Neurotoxico.* **13**: 15-25.
 15. Zhu, J.H. & A. Stadlin (2000) *Neurotoxicol. Teratol.* **22**: 193-203.
 16. Sethi, N., D. Nath, R.K. Singh & R.K. Srivastava (1990) *Fitoterapia* **61**: 547-50.
 17. Jensch, R.P., W.H. Vogel & R.L. Brent (1983) *J. Toxicol. Environ. Health* **11**: 37-59.
 18. Iezhitsa, I.N., A.A. Spasov & L.I. Bugaeva (2001) *Neurotoxicol. Teratol.* **23**: 213-22.
 19. Guyton, A.C. (1997) "Tratado de Fisiologia Médica" Ed. Guanabara Koogan, 7ª edição, Rio de Janeiro, pp. 621-29.
 20. Holson, R.R., J.E. Cogan & J. Adams (2001) *Neurotoxicol. Teratol.* **23**: 147-56.

