

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA  
MESTRADO EM FISILOGIA

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA  
PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO BRUTO  
DA *Mentha crispera***

GUSTAVO SANTIAGO DIMECH

RECIFE  
2003

GUSTAVO SANTIAGO DIMECH

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA  
PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO BRUTO  
DA *Mentha crisperi***

Dissertação submetida ao Curso de Pós graduação em Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Fisiologia.

Orientador:  
Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Co-Orientador:  
Prof. Dr. Parviz Afiatpour

RECIFE  
2003

DIMECH, Gustavo Santiago

Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato bruto da *Mentha crispera* / Gustavo Santiago Dimech. Recife, UFPE, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, 2003.

x, 84p., il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, 2003.

1.*Mentha crispera*. 2.toxicologia, 3. Reprodução, 4. Pré clínica – Tese. I. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia.II. Título.

**GUSTAVO SANTIAGO DIMECH**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA  
DO EXTRATO BRUTO DA *Mentha crisper***

Aprovado em 07 de fevereiro de 2003

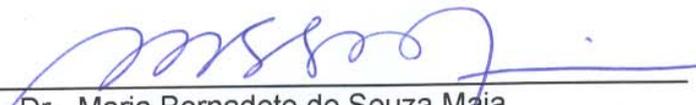
BANCA EXAMNINADORA



Prof. Dr. Raul Manhães de Castro



Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou



Prof.ª Dr.ª Maria Bernadete de Souza Maia



Prof.ª Dr.ª Carmen de Castro Chaves

Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; se não tivesse “amor” nada seria.

**Coríntios 13-3**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus...

Aos meus pais, Salvador e Nágela, pelo apoio e incentivo minha vida profissional e em todos os momentos na vida pessoal.

Ao meu orientador e amigo Almir Gonçalves Wanderley, que mais do que qualquer outra pessoa esteve presente em todas as alegrias e dificuldades durante a realização do mestrado.

Ao meu co-orientador Prof. Parviz Afiatpour, pela orientação, auxílio e disponibilidade de seu laboratório para realização dos experimentos.

As Professoras Liriane Evêncio e Rosa Santiago do departamento de Histologia e aos estagiários Reginaldo, Humberto e Luciano, que tornaram possíveis a análise Histológica.

Ao Laboratório Hebron, pela disponibilização do extrato da *Mentha crispata* que tornou possível a realização da tese.

As professoras Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim e Cláudia Sampaio de Andrade Lima, que são responsáveis pelo meu ingresso na pesquisa científica, e nunca deixaram de prestar um valioso incentivo na minha vida acadêmica.

Ao Professor Haroudo Sátiro Xavier, do Laboratório de Farmacognosia pela colaboração e a Karina Perrelli Randau pelo auxílio desde os tempos da graduação sendo a grande incentivadora para o ingresso no mestrado em fisiologia.

Aos professores Maria do Carmo de Araújo Fraga e Mario Sette pelas sugestões e colaborações durante todo o período de realização do Mestrado

A Professora Miracy Muniz do departamento de Ciências Farmacêuticas pela doação reagentes que tornaram possíveis o prosseguimento dos trabalhos.

Ao Professor Carlos Peres da Costa pela grande colaboração na revisão do manuscrito em inglês.

Ao professor Vicente Alexandre Alves e Família pela grande colaboração durante a fase inicial de minha dissertação.

Aos todos os professores e colegas do departamento de Fisiologia e farmacologia;

A família Perrelli Randau, pelo incentivo e amizade que me foi dispensado durante a realização desta dissertação

Aos técnicos Severino (in memoriam) e Rejane por sempre estarem dispostos a ajudar durante todo o período da dissertação, e a todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

Aos Amigos Alfredo, João Eudes, DUDA, Junior ceará, Adriana, Thiago, Erick, Carol e a todos os amigos do departamento de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio e incentivo.

A Alba Tatiana Serafim do Nascimento que deu o apoio e carinho na hora certa, para a conclusão desta dissertação

A Enrik Barbosa de Almeida, mais que um amigo, um irmão presente em todos os momentos dando sempre apoio e incentivo.

LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
<b>I INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 TOXICOLOGIA GERAL .....	01
1.1.1 ESTUDOS DE DESENVOLVIMENTO – REPRODUÇÃO E TERATOGENESE.....	01
1.2 DROGA E EMBRIÃO.....	05
1.3 TESTES TOXICOLÓGICOS.....	06
1.3.1 ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA.....	07
1.3.2 ESTUDOS DE TOXICIDADE SUBCRÔNICA.....	07
1.4 USO DE PLANTAS ATUALMENTE.....	08
1.5 ESTUDOS SOBRE O GÊNERO <i>MENTHA</i> .....	10
1.5.1 BOTÂNICO.....	10
1.5.2 QUÍMICO.....	12
1.5.3 FARMACOLÓGICO.....	13
1.5.4 TOXICOLÓGICO.....	16
1.6 MATERIAL BOTÂNICO .....	17
<b>II OBJETIVO.....</b>	<b>18</b>
2.1 GERAL.....	18
2.2 ESPECÍFICO.....	18
<b>III MATERIAIS E MÉTODO.....</b>	<b>19</b>
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	19
3.2. ANIMAIS.....	19
3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	19
3.3.1 OBSERVAÇÕES GERAIS .....	19
3.3.2 TOXICIDADE AGUDA.....	20
3.3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO SUBAGUDO DO EB SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTORA DE RATOS DE AMBOS OS SEXOS.....	20
3.3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO SUBAGUDO DO EB SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM RATAS PRENHAS.....	21
3.3.4.1 TRATAMENTO DURANTE O PERÍODO GESTAÇÃO.....	21
3.3.4.2 TRATAMENTO COM EB DURANTE AS DIFERENTES FASES DA GESTAÇÃO.....	21
3.3.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO EB (1,0g/kg) SOBRE O PESO DOS RATOS ADULTOS E DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS.....	22
3.3.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1,0g/kg) SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO EM RATOS DE AMBOS OS SEXOS.....	22
3.3.7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1,0g/kg) SOBRE A MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DE ÓRGÃOS.....	23
3.3.7.1 CORAÇÃO.....	25

3.3.7.2	RINS.....	26
3.3.7.3	CÉREBRO.....	26
3.3.7.4	GENITÁLIA ACESSÓRIA.....	26
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
3.9	REAGENTES.....	27
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	28
4.1.1	OBSERVAÇÕES GERAIS.....	28
4.1.2	TOXICIDADE AGUDA.....	28
4.1.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO SUBAGUDO DO EB SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTORA DE RATAS.....	29
4.1.3.1	FÊMEA TRATADA COM EXTRATO BRUTO X MACHO NÃO TRATADO.....	29
4.1.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO SUB AGUDO DO EB SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM RATAS PRENHAS.....	33
4.1.4.1	TRATAMENTO DURANTE O PERÍODO GESTAÇÃO.....	33
4.1.4.2	TRATAMENTO COM EB DURANTE AS DIFERENTES FASES DA GESTAÇÃO.....	35
4.1.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EB SOBRE A FERTILIDADE DE RATOS.....	37
4.1.6	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1,0g/kg) SOBRE O PESO DOS RATOS ADULTOS E DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS.....	40
4.1.7	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1,0g/kg) SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO EM RATOS DE AMBOS OS SEXOS.....	43
4.1.8	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1g/kg) SOBRE A MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DOS ÓRGÃOS. ....	47
4.1.8.1	CORAÇÃO.....	47
4.1.8.1.1	DADOS MORFOLÓGICOS.....	47
4.1.8.1.2	DADOS MORFOMÉTRICOS.....	49
4.1.8.2	RINS.....	50
4.1.8.2.1	DADOS MORFOLÓGICOS.....	50
4.1.8.2.2	DADOS MORFOMÉTRICOS.....	52
4.1.8.3	CÉREBRO.....	53
4.1.8.3.1	DADOS MORFOLÓGICOS.....	53
4.1.8.3.2	DADOS MORFOMÉTRICOS.....	57
4.1.8.4	TESTÍCULOS E TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	57
4.1.8.4.1	DADOS MORFOLÓGICOS.....	57
4.1.8.5	OVÁRIOS E TUBA UTERINA.....	61
4.1.8.5.1	DADOS MORFOLÓGICOS.....	61
<b>V</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>VI</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>VII</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>
<b>VIII</b>	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA I	Variáveis de reprodução obtidos através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: fêmea tratada (EB, 0,5g/kg/30dias, v.o.) x macho não tratado.....	31
TABELA II	Variáveis e reprodução obtidos através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: fêmea tratada (EB, 1,0g/kg/30dias, v.o.) x macho não tratado.....	32
TABELA III	Parâmetros reprodutivos de ratas tratadas durante a gestação (cerca de 22 dias) com EB 0,5g/kg/dia, v.o.....	34
TABELA IV	Valores de implantação e índice de reabsorção após administração do EB de <i>Mentha crispera</i> (0,5g/kg, v.o.) nos grupos controle e tratado durante as fases de fecundação (2º ao 7º dia), embriogênica (8º ao 14º dia) e fase fetal (15º ao 21º dia).....	36
TABELA V	Variáveis de reprodução obtidos através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: macho tratado (EB, 0,5g/kg/30dias,v.o.) x fêmea não tratada.....	38
TABELA VI	Variáveis de reprodução obtidos através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: macho tratado (EB, 1,0g/kg/30dias,v.o.) x fêmea não tratada.	39
TABELA VII	Valores dos pesos de órgãos (mg)/100g de peso do animal, após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com 1,0g/kg de EB pela via oral respectivamente em ratos de ambos os sexos.....	42
TABELA VIII	Valores dos parâmetros bioquímicos após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB 1,0g/kg de <i>Mentha crispera</i> pela via oral em ratos machos adultos.....	43
TABELA IX	Valores dos parâmetros bioquímicos após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB 1,0g/kg de <i>Mentha crispera</i> pela via oral em ratas adultas.....	44
TABELA X	Valores dos parâmetros hematológicos após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB (1,0g/kg) pela via oral em ratos machos adultos.....	45
TABELA XI	Valores dos parâmetros hematológicos após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB (1,0g/kg) pela via oral em ratos fêmeas adultas.....	46
TABELA XII	Critérios utilizados pela comunidade Européia na classificação de toxicidade.....	66

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Valores dos pesos corporais após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB 1,0g/kg de <i>Mentha crispera</i> pela via oral em ratos fêmeas (A) e machos (B) adultos.....	41
FIGURA 2	Fotomicrografia de corte histológico transversal de fibras musculares do miocárdio de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	47
FIGURA 3	Fotomicrografia de corte transversal do miocárdio de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	48
FIGURA 4	Fotomicrografia de corte longitudinal de fibras musculares do miocárdio de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	48
FIGURA 5	Média da morfometria de fibras musculares do miocárdio de ratos submetidos a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	49
FIGURA 6	Fotomicrografia de corte transversal da região cortical de rim de rato submetido a tratamento prolongado com o EB (1,0g/kg, v.o, por 30 dias).....	50
FIGURA 7	Fotomicrografia de corte transversal da região cortical de rim de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	51
FIGURA 8	Resultados da morfometria da região cortical do rim de ratos submetidos a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	52
FIGURA 9	Fotomicrografia do córtex cerebral de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	55
FIGURA 10	Fotomicrografia do córtex cerebral de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	55
FIGURA 11	Fotomicrografias do córtex cerebral de ratos submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	56
FIGURA 12	Fotomicrografia do córtex cerebral de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	56
FIGURA 13	Resultados da morfometria do córtex cerebral de ratos submetidos a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o ).....	57
FIGURA 14	Fotomicrografia do testículo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	58

FIGURA 15 Fotomicrografia do testículo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	58
FIGURA 16 Fotomicrografia do túbulo seminífero de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	59
FIGURA 17 Fotomicrografia do epidídimo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	60
FIGURA 18 Fotomicrografia do epidídimo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	60
FIGURA 19 Fotomicrografia do ovário de rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	61
FIGURA 20 Fotomicrografia da região cortical do ovário de rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg).....	62
FIGURA 21 Fotomicrografia da região cortical do ovário da rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	62
FIGURA 22 Fotomicrografia dos corpos lúteos da rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	63
FIGURA 23 Fotomicrografia da tuba uterina com suas estruturas características de rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o).....	64

## RESUMO

Neste trabalho procuramos avaliar a segurança no uso do extrato bruto (EB) da *Mentha crispera*, único ingrediente ativo do Giamebil Plus®. Para tal, foram realizados estudos de toxicologia pré-clínica. O EB administrado em camundongos e ratos por via oral (0,1 a 2,0g/kg) não produziu alterações comportamentais em ambas as espécies, contudo, por via i.p. mostrou-se tóxico provocando a morte em camundongos e ratos respectivamente de 100 e 80% dos animais após 48h de observação. Em ratos, os valores estimados da DL<sub>50</sub> (g/kg) de 24 horas por via i.p. foram 1,04 (0,98-1,09) e 0,63 (0,57-0,70) respectivamente para machos e fêmeas. Por via oral, não foi possível estimar a DL<sub>50</sub>, pois não observamos mortes, até 4,0g/kg. Nos estudos de fertilidade em ratos de ambos os sexos, o tratamento com EB (0,5 e 1,0g/kg, v.o.), durante 30 dias antes do acasalamento não induziu alterações nos parâmetros: relação prole/mãe; índices de fertilidade (relação de ratas prenhas por acasaladas); gestação (percentagem de fêmeas prenhas com fetos vivos); viabilidade (percentagem de sobrevivida após quatro dias); lactação (percentagem de sobrevivida após 28 dias) e o peso dos filhotes no 1º e 28º dia e proporção macho e fêmea. Da mesma forma, pela avaliação dos mesmos parâmetros anteriores, o tratamento, durante o período de gestação (cerca de 22 dias), não produziu alterações no desenvolvimento embrionário como também no período pós-natal. Em outro Protocolo, o tratamento com EB (0,5g/kg, v.o.) nas fases de fecundação (1º ao 7º dia), embriogênica (8º ao 14º dia) e fetal (15º ao 21º dia) não modificou o número de implantes e reabsorções em relação ao grupo controle. Não foram observadas alterações nos pesos úmidos e na morfologia macroscópica do coração, fígado, baço, rim, cérebro, pulmão, glândula adrenal, ducto deferente, testículo, ovário e útero, após a administração prolongada por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o.). Como também não ocorreram alterações na análise da microscopia e morfometria do coração, rim, córtex cerebral e genitálias acessórias. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos após tratamento com EB (1,0g/kg, v.o.) por 30 dias, não foram alterados. O conjunto dos resultados permite concluir que o EB da *Mentha crispera* apresenta baixa toxicidade por via oral e não produz efeitos tóxicos sobre a reprodução em ratos.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the crude extract (CE) of *Mentha crispata*, the only active ingredient of Giamebil Plus® in pre-clinical toxicological studies. When EB was administered in mice and rats by the oral route (0,1 to 2,0g/kg) it did not produce behavioral changes in the two species, however it was administered intraperitoneally (i.p.) it showed itself to be toxic producing death in 100% of mice and 80% of rats after 48 hours of observation. In rats, the estimated values for DL<sub>50</sub> (g/kg) for 24h by i.p. were 1,04 (0,98-1.09) and 0,63(0,57-0,70) respectively for males and females. It was not possible to estimate the DL<sub>50</sub> for the oral route because no death were accounted for doses up to 4,0g/kg. In the fertility studies with rats of both sexes, treatment with CE (0,5 and 1,0g/kg orally) during 30 days before mating did not induce significant changes in the mother/offspring relation; in the fertility index (relation between pregnant and mated rats); in gestation (percentage of pregnant females with live fetus), in viability (percentage of survival after 28 days) and in the weight of the litters on the 1<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> day and in the proportion of male to female. In the same way in the rats the evaluation of the aforesaid parameters, the treatment during the gestation period (approximately 21days) did not produce changes in the embryonic as well as the period after birth. In another protocol, treatment with EB (0.5g/kg orally) in the fecundation (1<sup>st</sup> to 7<sup>th</sup> day), embryogenic (8<sup>th</sup> to 14<sup>th</sup> day) and fetal (15<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> day) did not changes were observed in the wet weights and in the macroscopic morphology of heart, liver, spleen, kidney, brain, lung, adrenal gland, duct, testicles, ovary and uterus, after administration that lasted 30 days with EB (1.0g/kg, v.o). Neither change were noticed in the microscopy of and morphology of heart, kidney, cerebral cortex and genital organs. No changes in biochemical and hematological parameters were observed after Treatment with EB (1,0/kg orally). The results lead us to conclude that *mentha crispata* presents low toxicity when used by the oral route does not produce any toxic effects on reproduction

# **I - INTRODUÇÃO**

## **1.1 - TOXICOLOGIA GERAL**

A Organização Mundial de Saúde (OMS), congregando e filtrando a experiência dos maiores centros de pesquisa em Farmacologia e Toxicologia, criou um setor importante e ativo, exclusivamente dedicado ao uso racional de medicamentos. (WHO, 1978). De acordo com a OMS, muitos efeitos de drogas observados em animais podem ter, até certo ponto, elevado valor de aplicação para a espécie humana, motivo do largo emprego dos testes farmacológicos e toxicológicos na determinação da eficácia e toxicidade de drogas (WHO, 1978).

Toda droga, segundo a Farmacologia, pode atuar como agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposições (doses únicas ou múltiplas), via de administração (oral, inalatória, dérmica, parenteral) (CASTRO, J.A., 1993). Se, de um lado, todas as substâncias podem ser potencialmente tóxicas, por outro, essas podem ser usadas de forma segura desde que as condições de exposição sejam mantidas abaixo dos níveis de toxicidade (CASTRO, J.A., 1993).

A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de causar dano grave ou morte aos organismos (DRAIZE, J.H., *et al.*, 1944). Para que isso ocorra é indispensável à interação da substância com o organismo. O efeito é função da dosagem (ou concentração) do agente químico envolvido e do tempo de interação com o organismo. A exposição implica na interação do agente químico com o organismo de modo a poder exercer o seu efeito em nível tecidual e celular (DRAIZE, J.H., *et al.*, 1944).

### **1.1.1 - ESTUDOS DE DESENVOLVIMENTO – REPRODUÇÃO E TERATOGENESE**

Até 1962, antes da tragédia da talidomida, os farmacologistas e toxicologistas na avaliação de medicamentos, não se preocupavam com os possíveis efeitos teratogênicos, carcinogênicos ou mutagênicos. Atualmente, porém essas pesquisas se tornaram essenciais e de rotina no estudo da

segurança dos produtos químicos, apesar de sua complexidade (CLARK, D.O., 1993).

Os efeitos dos fármacos sobre a reprodução e o desenvolvimento embrionário também precisam ser determinados. Toxicologia do desenvolvimento é o estudo dos efeitos adversos no organismo em desenvolvimento ocorrendo a qualquer hora durante a vida do organismo que se submete à da exposição a agentes químicos ou físicos antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou pós-natal até a puberdade. (SCHWETZ, B.A., *et al.*, 1991).

As drogas podem interferir nos diversos processos de reprodução, não só causando malformações e matando o embrião, como também, por exemplo, bloqueando a gametogênese ou evitando a fertilização. Os estudos das ações das drogas sobre as diversas fases do processo reprodutor visam aos efeitos sobre: fertilidade, transporte e implantação do ovo, embriogênese e organogênese, parto, recém-nascido, lactação, desmame e cuidado com a prole, anormalidades pós-natais, comportamento sexual, ciclos estral e menstrual, ritmos de concepção e funções placentária e uterina (SCHWETZ, B.A., *et al.*, 1991).

De acordo com a OMS, o período teratogênico maior se situa na embriogênese. (MENEGOLA, E., *et al.*, 1998). No rato, esse período corresponde do 7º ao 15º dia quando se observa a diferenciação sexual e a organogênese. Além disso, o desvio do desenvolvimento pode também ser induzido por influências adversas durante todo o período gestacional. É também possível que o desenvolvimento no período pós-natal possa ser alterado em termos estruturais e metabólicos por compostos administrados no período pré-natal. (MENEGOLA, E., *et al.*, 1998).

As malformações podem ser causadas pela ação direta da droga sobre o feto, ou, secundariamente, através da ação sobre o organismo materno (MENEGOLA, E., *et al.*, 1998).

O período pré-natal é caracterizado por uma intensa histogênese e citodiferenciação dos órgãos já formados, tornando-se uma fase altamente vulnerável para o desenvolvimento microestrutural do cérebro e do sistema imune (BENESOVÁ, O., 1995). Drogas administradas perinatalmente, no tratamento da gravidez de risco ou de neonatos de risco podem levar a mudanças no processo de desenvolvimento e iniciar alterações na rede neural e na comunicação transmitida

por receptores (BENESOVÁ, O., 1995). Essas alterações podem não ser evidentes no nascimento, mas servem de base para vários defeitos funcionais de competência neuro-psico-imunológica as quais se tornariam gradualmente evidentes durante o amadurecimento e na idade adulta (BENESOVÁ, O., 1995).

Extratos a partir de diferentes solventes do fruto da *Jatropha curcas*, foram administrados em ratas prenhas por v.o., com o uso dos extratos a partir de metanol, éter de petróleo e diclorometano observou-se reabsorção fetal, esta é acompanhada quando o extrato é administrado entre o 6º e o 8º dias da gestação (GOONASEKA, M.M., *et al.*, 1995).

O látex liofilizado da *Euphorbia milii* (125mg/kg, v.o.), administrado em ratas do 6º ao 15º dia da gestação, causa retardamento do crescimento pré-natal e embriofetividade em doses superiores a 250mg/kg (SOUZA, C.A.M., *et al.*, 1997).

Foram administradas doses de 200 a 800mg/kg do extrato aquoso e 400mg/kg de extrato etanólico de *Salvia fruticosa*, o extrato etanólico (400mg/kg) reduziu o número de fetos viáveis e aumentou o número de reabsorções em ratas prenhas (ELBETIEHA, A., *et al.*, 1998). O extrato aquoso (800mg/kg) e o extrato etanólico (400mg/kg) administrados por 30 dias consecutivos não tiveram efeito no decorrer da gestação, mas esses extratos reduziram ambos o número de implantações e a viabilidade fetal e aumentaram o número de reabsorções em ratas prenhas (ELBETIEHA, A., *et al.*, 1998).

A administração por gavagem dos extratos de *Globuria arabica* e *Globuria alypum*, 800mg/kg do 1º ao 6º dia da gestação, não causa alterações, porém uma significativa redução do número de fetos viáveis e um aumento no número de reabsorções. No tratamento por 30 dias consecutivos em ratas não ocorreu efeito significativo na gestação, mas os extratos de ambas as espécies aumentaram o número de reabsorções e só a *Globuria alypum* leva a uma redução significativa no número de fetos viáveis (ELBETIEHA, A., *et al.*, 2000).

O extrato hidroalcoólico das folhas secas de *Peumus boldus* e a boldina mostraram efeito abortivo e ação teratogênica (ALMEIDA, E.R., *et al.*, 2000).

Na gravidez e lactação a segurança quanto ao uso de drogas deve ser levada ao extremo. A transferência de drogas via placenta ou leite é potencialmente deletéria para o embrião, feto ou lactente. (BEDRAN, J.N., 1988).

Há controvérsias quanto ao uso de antiparasitários durante a gravidez, pois certas drogas podem penetrar na circulação fetal (BEDRAN, J.N., 1988). O uso de antifolatos e primaquina, por exemplo, deve ser evitado (BEDRAN, J.N., 1988). Recentes evidências sugerem que algumas drogas podem provocar defeitos congênitos sobre o embrião e mesmo o feto. A quinina em grandes dosagens pode provocar aborto (BEDRAN, J.N., 1988). Pequena dose de pirimetamina requerida para supressão da malária parece segura na gravidez, mas as doses mais elevadas se associam com risco potencial de lesão fetal teratogênica (BEDRAN, J.N., 1988).

A furazolidona é contra-indicada para crianças com menos de um ano de idade, devendo ser evitada, também, durante a gestação e lactação (BEDRAN, J.N., 1988). O mebendazol pode provocar efeitos embriológicos e teratogênicos em ratas prenhas, mesmo em dosagens baixas (BEDRAN, J.N., 1988). Alguns antiparasitários têm efeito mutagênico durante a espermatogênese e/ou na fase precoce da espermato-histogênese, bem como exercem ação citotóxica na espermatogônia, espermátides e espermatozóides (BEDRAN, J.N., 1988).

A resposta ao agente teratogênico é amplamente dependente do genótipo do embrião (GAYLOR, D.W. & CHEN, J.J., 1993). A cortisona, por exemplo, quando administrada a camundongos e ratos, durante o período de prenhez, pode causar 100% de palatosquese (fissura no palato) na prole de camundongos e nenhum defeito em ratos. A talidomida que induz malformações tão drásticas no homem, coelhos e macacos, não apresenta o mesmo efeito quando administrada em ratos e camundongos (GAYLOR, D.W. & CHEN, J.J., 1993). A resposta ao agente teratogêno varia dependendo do estágio de desenvolvimento do concepto. A exposição a um mesmo agente teratogênico pode levar a respostas diferentes para o lado do concepto no que diz respeito à frequência ou mesmo à anomalia produzida (GAYLOR, D.W. & CHEN, J.J., 1993).

O período de gestação pode, com relação à sensibilidade a agentes teratogênicos, ser dividida em três estágios diferentes. O primeiro estágio compreende o período que vai desde a fecundação até a implantação do blastocisto e é também chamado período de “tudo ou nada.” Nesse período, que no homem vai até o 17º dia de gestação e no rato, coelho e camundongos até, o 5º dia, aproximadamente, encontra-se o embrião com células totipotentes, em

divisão, sem que haja acréscimo citoplasmático. E é nesse período que, dependendo do número de células atingidas pelo agente teratogênico, ocorre ou a reposição de células atingidas por células normais e como produto final da exposição em indivíduo normal ou, se atingindo em grande número de células, a embriofetalidade (FRITZ, H. & GIESE, K., 1990)..

Depois de implantado, o embrião inicia uma fase delicada, com intensa proliferação celular, movimento e deslocamento de massa celular e complicados sistemas de interação núcleo/citoplasma e intercelulares. Inicia-se, então, o chamado período organogênico, fase mais suscetível à ação de agentes teratogênicos e único período teratogênico da gestação. A sensibilidade do organismo varia dependendo da espécie e, dentro da mesma espécie, encontram-se diferenças conforme o agente teratogênico. O tipo de malformação depende ainda da fase evolutiva do embrião e da afinidade do agente químico pelo tecido embrionário, sendo que, para cada espécie existem períodos diferentes de sensibilidade (FRITZ, H. & GIESE, K., 1990).

Cessado o período embrionário, inicia-se o período fetal, caracterizado pela diferenciação histológica e funcional dos diferentes órgãos e aparelhos, além de um notável crescimento ponderal do conceito. Agentes teratogênicos administrados à mãe neste período de gestação, não levam ao aparecimento de malformações, mas podem indubitavelmente interferir com processos de proliferação celular que resultam em alterações funcionais de importantes sistemas tais como sistema nervoso central, imunológico ou endócrino, além de causar retardo geral de desenvolvimento (FRITZ, H. & GIESE, K., 1990).

## **1.2 - DROGA E EMBRIÃO**

Depois de incorporadas ao organismo materno, através da circulação sangüínea, as drogas alcançam o ser em formação. A natureza do composto químico, a dose, as condições de troca entre a mãe e o conceito são fatores importantes a serem considerados. O conceito atua como recipiente, e a placenta, interposta entre os dois organismos, atua como órgão regulador dessas trocas, participando ativa ou passivamente do processo (GANAPATHY, V. *et al.*, 1999).

A barreira placentária representa um conjunto de tecidos que se localizam entre a circulação materna e a fetal. Essa barreira pode facilitar ou restringir a passagem de drogas da circulação materna para fetal. As drogas que atravessam essa barreira biológica são as lipofílicas e não polares e de tamanho inferior a 1000Å, do mesmo modo como acontece na barreira hematoencefálica (GANAPATHY, V. *et al.*, 1999).

Na fase ovular, antes do blastocisto implantar-se, a concentração da droga nos líquidos tubários ou da cavidade uterina é o fator importante (ADLER, T., 1994). A fenitoína, o fenobarbital e o  $\delta$ -9 tetraidrocanabinol concentram-se nos segmentos do tecido reprodutor, especialmente no ovo, alterando também a composição das secreções que, nesse tempo, abrigam o ovo no seu curso em direção à cavidade uterina, onde deverá fazer a nidação (ADLER, T., 1994).

Quando se implanta o blastocisto, a nutrição se diz do *tipo histiotrófico*, com a participação modesta da circulação materna, mas os efeitos se tornam mais acentuados, pois as drogas incorporadas ao sangue materno atingem mais diretamente os tecidos ovulares (ADLER, T., 1994). A nicotina, o tiopental, a isoniazida, a DDT e a cafeína podem concentrar-se no blastocisto, em taxa duas vezes maior que no sangue materno (ADLER, T., 1994).

A passagem das drogas do organismo materno para o feto se faz por muitos mecanismos: difusão simples, difusão facilitada, transporte ativo, pinocitose. A placenta tem um papel de regulação metabólica, funcionando como se fosse um fígado acessório. Muitas drogas são biotransformadas ao nível do trofoblasto. (ADLER, T., 1994).

A talidomida é teratogênica porque a placenta ou feto a metaboliza produzindo metabólitos polares que são responsáveis pelos efeitos sobre o feto. A finalidade principal do estudo da transferência placentária de substâncias estranhas consiste no efeito que elas possam exercer sobre o feto (ADLER, T., 1994).

### **1.3 - TESTES TOXICOLÓGICOS**

Para que se conheçam os efeitos tóxicos de uma substância, é necessário proceder à realização de testes toxicológicos. Estes testes, aplicados em animais

de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem estabelecer os possíveis efeitos das substâncias em humanos expostos às mesmas (DELLA-ROSA, H.V., *et al.*, 1991). No Brasil, a Secretaria de Vigilância Sanitária, através da Portaria 116 de agosto de 1996, propôs normas para o estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos (BRASIL, 1996).

### **1.3.1.- ESTUDOS DE TOXICIDADE AGUDA**

A toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas administradas dentro de 24 horas. (FOWLER, J.S.L.N. & RUTTY, D.A., 1983). A via oral é indicada, mas outras vias de administração podem ser escolhidas, considerando-se a exposição humana (FOWLER, J.S.L.N. & RUTTY, D.A., 1983).

Os estudos de toxicidade aguda têm por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao valor estimado da DL<sub>50</sub>. (FOWLER, J.S.L.N. & RUTTY, D.A., 1983). Este parâmetro que representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50% dos animais de uma população é útil para identificar a toxicidade relativa da substância (FOWLER, J.S.L.N. & RUTTY, D.A., 1983).

### **1.3.2 - ESTUDOS DE TOXICIDADE SUBCRÔNICA**

Os testes de toxicidade subcrônica são realizados para se obterem informações sobre a toxicidade das substâncias químicas após exposições repetidas (FAUSTMAN, E.M., *et al.*, 1994). Os principais objetivos dos testes de toxicidade subcrônica são os de estabelecer doses nas quais não se observam os efeitos tóxicos, identificar, caracterizar os órgãos afetados e a gravidade das alterações, após exposições repetidas. Também é importante examinarem-se os efeitos após o período de tratamento e determinar se este efeito é devido a um acúmulo da substância ou não (FAUSTMAN, E.M., *et al.*, 1994).

Nos testes apenas animais saudáveis devem ser usados e a via de administração é geralmente a oral. Os animais devem ser examinados pelo menos

uma vez ao dia durante todo o experimento, com relação à manifestação de sinais de toxicidade. Os parâmetros mais comuns referem-se à modificação no consumo de ração, de peso, modificações na cor e textura dos pêlos, alterações respiratórias e circulatórias, anormalidades motoras e de comportamento e aumentos macroscópicos de massas de tecidos (BARNES D.G. & DOURSON, M., 1988).

Ao término do experimento, os animais são sacrificados e retirados os órgãos para avaliação anátomo-patológica. Avaliações hematológicas e bioquímicas no sangue também são realizadas no final do tratamento (BARNES D.G. & DOURSON, M., 1988).

Os estudos de toxicidade subcrônica servem, não apenas para caracterizar a relação dose/resposta, após administrações repetidas, mas também para fornecer dados para a escolha de doses nos estudos de exposição crônica (BARNES D.G. & DOURSON, M., 1988).

#### **1.4- USO DE PLANTAS ATUALMENTE**

Substâncias de origem vegetal têm sido usadas desde os tempos antigos como medicamentos para o tratamento de várias doenças. Estima-se que cerca de 25% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas (SHU, Y.Z., 1998).

O uso de plantas como medicamento é, provavelmente, tão antigo quanto à própria humanidade. O conhecimento desse uso foi obtido de duas maneiras básicas: a *experimentação*, de onde devem ter sido descobertos diversos alimentos, mas também por *instinto*, isto é, uma forma de relacionamento homem-natureza não racional. A favor da inclusão dessa segunda forma citada, encontra-se o fato de diversos animais silvestres procurarem “remédios em plantas”, como se “soubessem” racionalmente do valor terapêutico (GRAVES, A. H., 1945).

Pode-se dizer que a fitoterapia chega ao século 20 como a terapêutica predominante em relação a outros tipos. Além disso, representa uma preferência quanto à origem natural. Um exemplo disso encontra-se num artigo de BARROSO (1938).

“Fala-se muito em compostos syntheticos como Synonymos ou equivalente de compostos orgânicos naturais. Si, em verdade, no entanto, a natureza pode ser imitada, não pode de modo algum ser substituída”

Atualmente, apoiando-se em experiências anteriores e no conhecimento popular procura-se, através de uma pesquisa científica moderna, demonstrar a atividade terapêutica das plantas e usá-las a serviço da *fitoterapia* (BERG, M.E., 1982).

Nos últimos 15 anos, ocorreu um crescimento mundial do interesse em medicamentos naturais tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. Entretanto, existem dados insuficientes para a maioria das plantas, no sentido de garantir sua eficácia, qualidade e segurança (CALIXTO, J.B., 2000).

Um grande número de testes clínicos tem sido realizado com algumas drogas naturais, incluindo o extrato de *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum*, *Panax ginseng*, *Tanacetum parthenium*, *Allium sativum*, *Matricaria chamomilla*, entre outras (ARMSTRONG, N. S. & ERNST, E., 1999). Todas essas plantas medicinais têm um amplo mercado mundial e embora tenham sido avaliadas em diferentes ensaios clínicos. Novos ensaios melhor controlados e testes clínicos apropriados são ainda necessários para provar as suas eficácias (ARMSTRONG, N. S. & ERNST, E., 1999).

Comparados com as drogas sintéticas bem definidas, os medicamentos naturais exibem algumas diferenças devendo-se citar como principais que: os princípios ativos são freqüentemente desconhecidos; a padronização, estabilidade e o controle de qualidade são possíveis, mas não são fáceis de realizar; a avaliação e a qualidade do material bruto é freqüentemente problemática; a realização de ensaios clínicos bem controlados do tipo duplo-cego e estudos toxicológicos, para confirmar sua eficácia e segurança, são raros; o uso empírico na medicina popular é uma característica muito importante; apresentam uma ampla faixa terapêutica e são adequados para tratamentos crônicos; a ocorrência de efeitos adversos parece ser menos freqüente com medicamentos naturais, embora alguns ensaios clínicos randomizados bem controlados tenham revelado que eles também

existem e, finalmente, há custo menor em relação às drogas de origem sintética (CALIXTO, J.B. 2000).

De acordo com a OMS devido à pobreza e dificuldade de acesso à Medicina moderna, cerca de 65-80% da população mundial oriunda de países em desenvolvimento, depende essencialmente de plantas para a assistência primária à saúde (DE SMET, P.A.G.M., 1997). Geralmente, as maiores indústrias farmacêuticas têm demonstrado interesse na investigação de plantas como fonte para novas estruturas e também para o desenvolvimento de agentes fitoterápicos padronizados, com eficácia comprovada, segurança e qualidade (DE SMET, P.A.G.M., 1997).

Estima-se que, em 1997, o mercado Europeu de fitomedicamentos atingiu cerca de 7 bilhões de dólares. Esses medicamentos são distribuídos em 6 categorias terapêuticas: cardiovascular 27,0%; respiratório 15,3%; digestivo 14,4%; tônico 14,4%; hipnótico/sedativo 9,3%; tópico 7,4% e outros 12,0% (GRÜNWALD, J., 1995; BLUMENTHAL, M., 1999).

O mercado de medicamentos naturais na Ásia e Japão alcança 2,3 e 2,1 bilhões de dólares respectivamente, mas em nenhum outro país, como nos Estados Unidos, o mercado de fitomedicamentos cresce tanto. Poucos anos atrás, essa era uma categoria de medicamentos quase inexistente. O mercado alcançou cerca de 3,2 bilhões de dólares em 1996 e estima-se que cada americano gaste cerca de 54 dólares por ano, comprando esses medicamentos. Atualmente, várias plantas medicinais, tais como *Aloe vera*, *Panax quinquefolius*, *Alium sativum*, *Ginkgo biloba*, *Serenoa repens*, *Valeriana officinalis*, entre outras são cultivadas nos Estados Unidos e exportadas para a Europa e Oriente (CALIXTO, J.B., 2000).

## **1.5 - ESTUDOS SOBRE O GÊNERO *MENTHA***

### **1.5.1 - BOTÂNICO**

A família Labiatae compreende cerca de 220 gêneros e 4 mil espécies distribuídas em todo mundo, Têm grande importância industrial e econômica pela sua utilização na indústria de cosméticos, alimentos, plantas ornamentais, condimentos, farmacêutica e na medicina popular (BRITO, N.R.S., 1983).



A *Mentha crispa* que é uma *Laminaceae*, apresenta-se como uma planta herbácea rasteira, com touceiras de caule quadrangular. As flores se reúnem em forma de espiga, são miúdas e insignificantes. As folhas são crespas, redondas e opostas, exala odor forte e agradável sendo conhecida vulgarmente como “hortelã de folha miúda”, “hortelã panela” ou “hortelã rasteira” (BRAGA, R., 1983; ALMEIDA, E.R., 1993). Também chamada de *Mentha x villosa*, Hudson é um híbrido originário do cruzamento entre a *Mentha spicata* L. e a *Mentha suaveolens*, Ehrh. Essa planta aromática encontra-se distribuída em praticamente todo o território nacional, por ser facilmente cultivada em canteiros e hortas (MATOS, F.J.A., 1991).

A palavra *Mentha* deriva de *mintha*, nome de uma ninfa que a Deusa grega Perséfone, por ciúmes, transformou em planta. O gênero *Mentha* é considerado por muitos especialistas de difícil identificação (HARLEY, R.M., 1973). As causas dessa complexidade taxonômica são a plasticidade morfológica, facilidade de hibridização, propagação vegetativa, cultivo desde a Antigüidade e confusão da nomenclatura (HARLEY, R.M., 1973). A espécie cultivada pelo Laboratório Hebron (Caruaru-PE) é denominada *Mentha crispa*, entretanto, a denominação mais correta seria *Mentha spicata* L., segundo identificação realizada pelo Prof. Raymond R. Harley (Royal Garden of London) especialista nesta espécie. A imprecisão na denominação se deve também à grande facilidade de cruzamentos interespecíficos no gênero *Mentha*, pelos quais muitas vezes dados morfológicos externos não são suficientes para a correta classificação sistemática (HIRUMA, L.C.A. *et al.*, 1994).

Devido a falta de padronização na denominação da espécie, em nosso trabalho optamos pelo uso do nome *Mentha crispa*, entretanto, cabe salientar que as diferentes denominações da *Mentha*, de acordo com o Index Kuyenses (JACKSON, D, 1946), correspondem na realidade à mesma espécie.

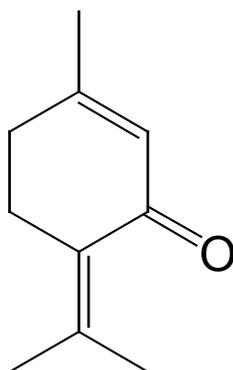
### 1.5.2 - QUÍMICO

Do ponto de vista químico, o gênero *Mentha* foi amplamente estudado. Pode-se constatar que a ocorrência de rotundifolona, como composto majoritário é mais freqüente no gênero *Mentha* devido à grande facilidade de cruzamento interespecífico como descrito anteriormente (HIRUMA, C. *et al.*, 1994).

Na espécie *crispa*, foram identificadas e isoladas várias substâncias a partir dos extratos hexânico e etanólico, entre elas, o glicosídeo do sitosterol, o ácido ursolínico e um flavonóide não identificado (MONTE, F.J.Q. *et al.*, 1990).

Utilizando as partes aéreas maceradas com etanol a 50% e a partição com solventes de polaridades crescentes, da fração butanólica foram isoladas cinco substâncias: ácido rosmarínico (componente majoritário), luteolina, duas flavonas e uma flavanona glicosilada (BARBOSA FILHO, J.M., *et al.*, 1992).

O óleo essencial, obtido das folhas da *Mentha x villosa* Hudson, contém linoleno, beta-cariofileno, gama-muroleno (CRAVEIRO, A.A., *et al.*, 1990), beta-cubebeno, 1,8-cineol, beta-pineno, linalol, cis-carofileno, beta-farneseno, gama-elemeno e um composto principal denominado rotundifolona que, aparentemente, ainda não havia sido relatado na literatura (BARBOSA FILHO, J.M., *et al.*, 1991). Esse composto é um monoterpene oxigenado de ocorrência rara, também conhecido como óxido de piperitenona (HIRUMA, C.A., 1993).



### **Oxido dePiperitenona**

O óleo essencial, obtido da *Mentha crispa* contém hidrocarbonetos terpênicos, terpenos oxigenados, sesquiterpenos ou sesquiterpenos oxigenados, que se se destacam como constituintes majoritários: óxido de piperitenona (30,3%), germacreno-D (8,2%) e beta-cariofileno (5,9%) (PIANOWSKI, L.F., 2000).

#### **1.5.3 - FARMACOLÓGICO**

Os estudos farmacológicos realizados com os extratos e com os óleos essenciais de diversas espécies de plantas do gênero *Mentha* revelaram propriedades farmacológicas diversificadas, inclusive como antimicótico e antiviral (GALLINO, M., 1986; BECZNER, L., *et al.*, 1992; CROWELL, P.L., 1997; BLASZCZYK, T., *et al.*, 2000).

O extrato etanólico da *Mentha piperita* (200-400mg/kg, v.o. ou i.p.) induziu analgesia avaliada pelos métodos das contorções abdominais e placa quente em camundongos e efeito antiinflamatório nos modelos de edema induzido por xileno na orelha de camundongos e granuloma induzido por “pellet” de algodão em ratos (ATTA, A.H. & ALKOFahi A., 1998).

Desde há tempo, os extratos e pós das partes aéreas da *Mentha crispa* têm despertado o interesse de farmacologistas, fitoquímicos e bioquímicos por seus constituintes, representados por diferentes classes de compostos, presentes nos extratos alcoólicos e nos seus óleos essenciais (KOKKINI, S., *et al.*, 1995; HAAS, L.F., 1995; PICCAGLIA, R., 1998; VOIRIN, B., *et al.*, 1999).

As folhas e as partes aéreas como um todo da *Mentha crispa*, são, sobretudo utilizadas pela medicina popular brasileira, particularmente no Nordeste, por

suas propriedades estomáquicas e carminativas, além de seu uso generalizado como condimento ou componente de saladas cruas (CORRÊA, M.P., *et al.*, 1975; BRAGA, R., 1983). A *Mentha x villosa* tem indicações populares como antiparasitária, estomáquica, calmante, analgésica e no tratamento de cólicas menstruais (LIMA C.A.H., *et al.*, 1994).

A Hebron Industrias Químicas e Farmacêuticas comercializa o Giamebil plus® (extrato de *Mentha crispa*) por suas propriedades comprovadamente amebicida (*Entamoeba histolytica*) e giardicida (*Giardia lamblia*), além de atividade anti-espasmódica o extrato fluido/seco a partir do caule e das folhas da *Mentha crispa* nas formas farmacêuticas de xarope (q.s.p 80mL, onde cada 5mL contém 1,25mL de extrato hidroalcoólico da *Mentha crispa*), comprimido (50mg do extrato seco) e gotas (q.s.p 20mL, onde cada 25 gotas contém 1,25mL de extrato hidroalcoólico da *Mentha crispa*). As ações do giamebil plus® são creditadas aos heterósidos de flavonóide e ácido rosmarínico. A posologia indicada para menores de 2, entre 2 e 12 e acima de 12 anos são respectivamente 2,5, 5,0 e 10mL três vezes ao dia, no caso de xarope; na forma de gotas, devem ser ministradas na quantidade de 12, 25 e 50 três vezes ao dia, e no caso comprimidos, devem ser utilizados dois comprimidos, três vezes ao dia. Todos os tratamentos durante cinco dias.

O óleo essencial da *Mentha x villosa* (250mg/kg, i.p.) em ratos e camundongos produziu atividade depressora do SNC, evidenciada pelos testes de potencialização do sono induzido por pentobarbital e analgesia verificada pelo teste de contorções abdominais induzida por ácido acético 0,8% (HIRUMA, C., *et al.*, 1992). Efeito analgésico similar foram observados por LIMA, C.A.H., *et al.* (1994) que sugeriram mecanismos centrais semelhantes aos de drogas opiáceas para justificar tal atividade.

O óxido de piperitenona (0,1 e 10µg/ml) presente na *Mentha x villosa* e em várias espécies de *Mentha*, apresenta efeito potencializador da contração induzida por acetilcolina (ACh), entretanto, doses maiores que 30µg/ml constituem depressor inespecífico do músculo liso intestinal nas contrações promovidas por KCl, ACh e tetraetilamônio (SOUSA, P.J.C., *et al.*, 1997). Estudando o efeito *in vitro* do extrato bruto de *Mentha crispa*, WANDERLEY, A.G. *et al.* (1999) demonstraram que esse apresenta efeito inibitório inespecífico sobre as

musculaturas lisas do jejuno, útero e ducto deferente de rato. Em adição, em ratos anestesiados, a administração do extrato produziu redução da P.A.

O óleo essencial da *Mentha x villosa* (OEMV, 0,3 a 20mg/kg, i.v.) apresenta efeito hipotensor em ratos anestesiados, atribuível, pelo menos em parte, ao óxido de piperitenona (OLIVEIRA, L.C., *et al.*, 1999). Em ratos não anestesiados, GUEDES, D.N. *et al.* (2000) sugeriram que OEMV produzisse liberação parcial de óxido nítrico (NO) pelo endotélio vascular. Por sua vez, CARNEIRO LEÃO R.F.L., *et al.* (2000) mostraram ausência operacional do sistema nervoso simpático e sugeriram uma possível ação vasodilatadora direta. Ação essa obtida também com o óxido de piperitenona (LAHLOU, S., *et al.*, 2001).

GUEDES, D. N., *et al.* (2002), sugerem que a ação hipotensiva da rotundifolona, o constituinte principal do EOMV, deve-se à estimulação não seletiva de receptores muscarínicos. LAHLOU, S., *et al.* (2002) mostraram que o tratamento com o óleo essencial da *Mentha villosa*, i.v. levou a redução da pressão sangüínea, sendo a indução de hipotensão e a bradicardia mecanismos independentes.

MELLO, A. C., *et al.* (1985) demonstraram que o tratamento de 21 pacientes comprovadamente portadores de protozoários e helmintos, com cápsulas contendo triturado de folhas, caule e raiz de *Mentha crispa*, produziu 100% de eficácia contra os protozoários e mostrou-se inativa para os helmintos. Os autores não observaram a presença de efeitos colaterais.

Testes *in vitro* com diferentes frações da *Mentha crispa* (5 a 10mg/ml/tubo) usando cultura de *Entamoeba histolytica* (cepa SAW 1627) levaram à mortalidade total das cepas em duas das seis frações obtidas (BORBA, M.O.P., *et al.*, 1990). Outros resultados obtidos pelo grupo sugerem que o EB da *Mentha crispa* (0,2mL/dia, v.o.) durante 20 dias também apresenta ação sobre o *Schistosoma mansoni*.

Portadores de tricomoníase urogenital, utilizando 180mg de EB da *Mentha crispa* durante 5 dias veiculado em cápsulas, apresentam percentual de cura entre 90 e 95% (MELO, A.M., *et al.*, 1992).

TEIXEIRA, M.J., *et al.* (1996) avaliaram o efeito leishmanicida do óleo essencial de *Mentha crispa* nas formas amastigota e promastigota e mostraram redução de mais de 90% da viabilidade na forma promastigota.

SANTANA, C.F. (1992) mostrou que o extrato hidroalcoólico da *Mentha* (84 e 168mg/dia, v.o.) por cinco dias, respectivamente, para 23 crianças e 99 adultos promoveu, 91% e 68% de cura respectivamente nos pacientes portadores de *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*.

#### 1.5.4 - TOXICOLÓGICOS

A idéia geral de que drogas naturais são muito seguras e livres de efeitos colaterais é falsa. Plantas têm centenas de constituintes e alguns são muito tóxicos, como por exemplo drogas citotóxicas derivadas de plantas, digitálicos, os alcalóides pirrolizidina, efedrina, ésteres de forbol, entre outros. Contudo, os efeitos adversos de muitas drogas naturais são relativamente menos freqüentes quando comparadas com drogas sintéticas, testes clínicos controlados embasam esta hipótese (DREW, A. & MYERS, S.P., 1997).

Na Alemanha, desde 1978, mais de quatro mil medicamentos naturais têm sido submetidos a farmacovigilância e muitos deles foram retirados do mercado por causa de seus efeitos deletérios para uso humano (KELLER, K., 1996).

Com relação ao gênero *Mentha* são relatados alguns estudos a cerca da toxicidade. Uma fração uterotônica da *Mentha arvensis* (Fração-UM) administrada em ratas prenhas por via subcutânea do 1º ao 10º dia da gestação produziu significativa interrupção da mesma (ANJANAPOTHI, D., *et al.*, 1981).

O efeito do óleo da *Mentha sp.* administrado por diferentes vias no final da gestação leva a uma significativa inibição dose-dependente da implantação e a parto prematuro, possivelmente devido a contração uterina (LU, Y. F., *et al.*, 1989).

O extrato etanólico de *Mentha arvensis* reduz a síntese de frutose na vesícula seminal alterando a viabilidade dos espermatozóides em ratos após 30 dias de tratamento (MATHUR, R, 1991).

SHARMA, N., & JACOB, D. (1997, 2001, 2002) demonstraram que o tratamento em dias alternados, durante 20 dias com uma fração isolada do extrato de éter de petróleo da *Mentha arvensis* (1mg/rato) produzia infertilidade. A razão parece residir na ausência de espermatozóides na cauda dos epidídimos como conseqüência da interrupção da espermatogênese. Esse extrato (10 e

20mg/rato, v.o.) 20 40 e 60 dias, produz redução na prole, dose e tempo-dependente em ratos machos tratados e acasalados com fêmeas controle, redução no peso dos testículos, epidídimo, cauda epididimal, contagem de espermatozóides, motilidade, viabilidade e morfologia, sendo essa infertilidade reversível, sem efeito adverso para o rato. Resultados semelhantes foram obtidos com o uso do extrato metanólico.

## 1.6 - MATERIAL BOTÂNICO

Para o nosso estudo, utilizamos o extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas da *Mentha crispa* a qual é cultivada e coletada numa plantação particular do laboratório Hebron, situada a 15 km de Caruaru-PE, plantio controlado com adubo orgânico, sem possibilidade de contaminação química sendo o controle de pragas efetuado biologicamente.

Exemplares da *Mentha crispa*, cultivados pelo Laboratório Hebron, foram previamente padronizados através de estudos fitoquímicos. As extrações foram realizadas em Soxhlet, utilizando-se as partes aéreas da *Mentha crispa* seca, com etanol P.A. pelo período de 12 horas consecutivas (PETROVICK, P. R., 1997), após as extrações foi realizada uma filtração a vácuo seguida de concentração em rotavapor a pressão reduzida. O extrato obtido foi seco em dessecador a vácuo e apresentou um rendimento de 6,1%, em relação ao peso inicial da erva seca (PIANOWSKI, L. F., 2000).

Foram realizados estudos (PIANOWSKI, L. F., 2000) a partir do extrato etanólico da *Mentha crispa* cultivado pelo laboratório Hebron, comparando-o com padrões de moléculas isoladas e se observou que o processo extrativo foi eficaz não interferindo na concentração dessas moléculas.

No extrato etanólico, através da cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa com espectrometria de massa, foram identificados, ácidos ursólico, caféico, rosmarínico e luteolina, bem como o glicosídeo sitosterol. E no óleo essencial encontram-se os seguintes constituintes majoritários. óxido de piperitenona,  $\alpha$ -pineno, germacreno-D, mirceno, 1,8-cineol, 1,8-cineol, limoneno,  $\rho$ -cimeneno, carvona, cariofileno, humuleno entre outros (PIANOWSKI, L. F., 2000).

Os exemplos descritos na introdução desse trabalho, reforçam a idéia de que o gênero *Mentha* é bastante explorado, sob os aspectos: botânico, químico, farmacológico e toxicológico. Este último, nos pareceu particularmente atraente pela carência de estudos toxicológicos pré-clínicos com a espécie *crispera* e igualmente por ser um fitoterápico amplamente comercializado e prescrito, inclusive, para mulheres no primeiro trimestre da gravidez, em substituição a antiparasitários tradicionais e, finalmente, para dados da literatura que mostram que outras espécies do gênero *Mentha* possuem efeitos tóxicos sobre o processo de reprodução.

## **II – OBJETIVO**

### **2.1 – GERAL**

Avaliar a toxicidade do extrato Bruto (EB) da *Mentha crispera*.

### **2.2 – ESPECÍFICO**

- Estimar o valor de DL<sub>50</sub> em ratos e camundongos;
- Estudar o efeito tóxico do EB sobre a performance reprodutiva de ratos;
- Avaliar a ação embriofetotóxica do EB em ratas;
- Investigar a possibilidade de alterações hematológicas bioquímicas e morfológicas, após administração subcrônica do EB em ratos

### III - MATERIAIS E MÉTODO

#### **3.1 MATERIAL BOTÂNICO**

O material utilizado foi constituído pelo caule e folhas da *Mentha crispa*, classificada e identificada pelo Herbário do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, sob o número **27312**. A identificação do material foi realizada através do envio de exsiccatas de ramos floridos com tamanhos e fases de crescimento variados.

O EB da *Mentha crispa* é o único ingrediente ativo do medicamento Giamebil plus®. O extrato fornecido pelo laboratório Hebron foi concentrado em rota evaporador, liofilizado e armazenado em congelador (-4°C). O liofilizado foi resuspenso em água destilada a 10 ou 20% antes dos procedimentos experimentais.

#### **3.2 - ANIMAIS**

Foram utilizados ratos Wistar, *Rattus norvegicus* var. albinus entre 90 a 150 e 60 a 120 dias de idade, respectivamente para machos e fêmeas e camundongos albinos, *Mus musculus* adultos (25 a 35g) de ambos os sexos, originados, respectivamente, do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Instituto de Antibióticos da UFPE. Os animais receberam água e dieta (ração marca Labina) *ad libitum* e foram mantidos em condições controle de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (22-27°C).

#### **3.3- PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

##### **3.3.1- OBSERVAÇÕES GERAIS**

Os efeitos gerais do EB de *Mentha crispa* nas doses de 0,1; 0,25; 0,5kg; 1,0 e 2,0g/kg) por v.o. ou i.p. foram observados em camundongos de ambos os sexos e ratos machos. Os animais foram distribuídos em grupos de 6-8 animais, privados de ração por 12 horas, durante as quais, os grupos controles receberam água no maior volume. Após a administração do extrato EB de *Mentha crispa*, os

animais foram observados por 180 minutos, numa superfície plana e cercada e, em seguida, foram transferidos para suas respectivas gaiolas e observados a intervalos regulares (três horas), por 72 horas. Efeitos tais como: movimentos estereotipados, deambulação, depressão, diarreia, frequência respiratória, entre outros, foram observados e anotados segundo a tabela de MALONE (1977). Os órgãos dos animais que morriam eram submetidos a uma análise macroscópica.

### **3.3.2 - TOXIDADE AGUDA.**

O EB foi administrado em doses crescentes (0,5; 1,0; 2,0; 4,0g/kg) por v.o. em ratos e camundongos e i.p. (0,5; 1,0; 2,0g/kg) em ratos, de ambos os sexos (n=10/grupo), privados de ração por 12 horas. A mortalidade em cada grupo foi observada por 14 dias e o valor da DL<sub>50</sub> foi estimado segundo o método de MILLER, L.C., & TAINTER, M.L., (1944).

### **3.3.3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO SUBAGUDO DO EB SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTORA DE RATOS DE AMBOS OS SEXOS.**

Grupos com seis e dez ratas virgens, com idades entre 90 e 120 dias, foram tratadas respectivamente com EB 0,5 e 1,0 (g/kg), v.o., durante 30 dias consecutivos. Nesse período, foram observadas as atividades gerais dos animais e media semanal do peso. No primeiro dia após o tratamento, ambos os grupos (com seis e com dez ratas) foram submetidos ao acasalamento com ratos machos não tratados, respectivamente nas proporções 1:1 e 1:2 (macho:fêmea). O sucesso da cópula foi confirmado pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, fato que foi admitido como 1º dia de gestação. Após o nascimento da prole, foram determinados os parâmetros: número de prole/mãe, índice de fertilidade (nº de ratas prenhas/ nº de ratas acasaladas), índice de gestação (% de fêmeas prenhas/no. de fetos vivos), índice de viabilidade (% de sobrevivida após 4 dias), índice de lactação (% de sobrevivida após o 21º dia de nascimento/nº de nascimentos), peso corporal no 1º e 28º dia, proporção macho/fêmea, atividade

geral e ainda observados aspectos macroscópicos gerais como polidactilia, as quais, foram comparadas com o grupo controle.

O mesmo procedimento foi realizado para os grupos macho tratado x fêmea não tratada e macho não tratado x fêmea não tratada. Esse último grupo serviu como controle e recebeu apenas água (ELBETIEHA, A. *et al.*, 1998).

### **3.3.4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO SUBAGUDO DO EB SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM RATAS PRENHAS.**

#### **3.3.4.1 - TRATAMENTO DURANTE O PERÍODO DA GESTAÇÃO**

Três grupos contendo 14, 10 e 10 ratas adultas virgens foram tratados por v.o. respectivamente com EB (0,5 e 1,0g/kg) e água (controle) a partir do 1º dia de gestação (presença de espermatozóides no esfregaço vaginal), até a gestação a termo. Após o nascimento da prole foram determinados os mesmos parâmetros descritos no item anterior (PAUMGARTTEN, F.J. *et al.*, 1998).

#### **3.3.4.2 - TRATAMENTO COM EB DURANTE AS DIFERENTES FASES DA GESTAÇÃO**

Após 24h da cópula (presença de espermatozóides no esfregaço vaginal) trinta e seis ratas (n=6/grupo), com idades entre 90 e 120 dias, das quais a metade foi tratada por v.o., com EB 0,5g/kg e a outra recebeu água (controle) durante a fase I ou de fecundação (1º ao 7º dia de gestação) fase II ou embrionária (8º ao 14º dia de gestação) e fase III ou de desenvolvimento fetal (15º ao 21º dia). Antes do nascimento dos filhotes, os grupos foram sacrificados e após laparotomia, determinado o número de implantes e reabsorções e observada a presença ou não de má-formação fetal. (ALMEIDA, E.R. *et al.*, 2000).

### **3.3.5 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO EB (1g/kg) SOBRE O PESO DOS RATOS ADULTOS E DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS .**

Quatro grupos (n=10/grupo) de ratos machos virgens, com idades entre 90 e 150 dias foram tratados, durante 30 dias consecutivos por via oral, com EB 1,0g/kg ou água (controle). Durante o período do tratamento foram observados os comportamentos dos animais referentes à deambulação, consumo de água e ração, assim como, determinação semanal do massa corporal. Ao final do tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos: coração, fígado, baço, rim, cérebro, pulmão, glândula adrenal, ducto deferente, testículo, ovário e útero foram identificados, removidos e determinado seu peso úmido em balança analítica (VIJAYALAKSHMI, T., *et al.*, 2000).

### **3.3.6. - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1g/kg) SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO EM RATOS DE AMBOS OS SEXOS .**

Vinte e oito animais correspondendo a dois grupos machos e dois fêmeas (n=7/grupo) foram tratados durante 30 dias consecutivos pela v.o. com EB 1,0g/kg ou água (grupo controle).

Para coleta de urina de 24 horas, cinco animais de cada grupo, na fase final do tratamento foram transferidos para gaiolas metabólicas, sendo dosados a uréia (UV); a creatinina e o ácido úrico (cinética enzimática).

No penúltimo dia de tratamento, a ração dos animais foi retirada e no 30º dia com os animais sob anestesia com éter, procedeu-se à coleta de sangue (cerca de 4mL) por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro. Em seguida, o sangue foi processado para determinação do hemograma (analisador de células hematológicas Coulter TKS) e os parâmetros bioquímicos: glicose (plasma): enzimático colorimétrico; creatinina (soro): cinética enzimática; transaminases (soro): cinética enzimática; colesterol total (soro): enz. colest. oxidase/peroxidase; triglicerídeos (soro): GPO-PAP – enzimático colorimétrico;

fosfatase alcalina (soro): cinético enzimático; bilirrubinas (soro): Mallou-Evelyn e proteínas totais e frações (soro): biureto/VBC, através do aparelho Targa 3000 Randon Acess Chemistry Analyser. (COELHO, M.G.P., *et al.*, 2001).

### **3.3.7 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUB-AGUDA DO EB (1g/kg) SOBRE A MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DOS ÓRGÃOS.**

Foram utilizados 18 ratos, subdivididos em três grupos: controle (n=6) e tratado macho (n=6) e fêmea (n=6) com EB 1g/kg durante 30 dias consecutivos, por via oral. Ao final desse período, os animais foram anestesiados com éter e perfundidos (inicialmente, com solução de NaCl em tampão fosfato de sódio a 0,05M e, em seguida, com solução fixadora de formaldeído a 10%, em tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,4) através de catéter inserido no ventrículo esquerdo. Após a perfusão, os tecidos foram cuidadosamente retirados e imersos em líquidos de Bouin (obtido a partir do ácido pícrico saturado, formol puro e ácido acético glacial) utilizando-se 10x o volume e fixados “*in totum*” durante 48 horas, à temperatura ambiente (FARRIS, E. & GRIFFITH, J.Q. 1971; BAKER, J.H., *et al.*, 1979).

Após a fixação, as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina (LISON, L., 1960; MICHALANY, J., 1980) conforme o que segue descrito abaixo:

DESIDRATAÇÃO: álcool etílico em ordem crescente

álcool a 70% - de um dia para o outro (até 24h) – renovado 3 vezes

álcool absoluto (100%) I – 1 hora e 30 minutos

álcool absoluto (100%) II – 1 hora e 30 minutos

DIAFANIZAÇÃO: Dois banhos de xilol de 1 hora cada

xilol I – 1 hora

xilol II – 1 hora

IMPREGNAÇÃO: Parafina líquida – estufa a 57- 60° C – dois banhos de 1 hora cada

Parafina I – 1 hora

Parafina II – 1 hora

INCLUSÃO: Foi realizada inclusão em parafina a temperatura ambiente de um dia para outro.

Com o material incluso em parafina, foram obtidos cortes com espessura de aproximadamente 7µm, em um micrótomo Leica RM 2025, utilizando-se navalhas descartáveis da marca Jung. Após a microtomia, as preparações foram colocadas rapidamente em banho-maria para estiramento dos cortes, e foi obtida a pescagem com uma lâmina de vidro, limpa e besuntada com albumina. Logo após a pescagem, procedeu-se à secagem do material em estufa com temperatura ( $\pm 37^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 horas. A seguir, as preparações foram desparafinadas e hidratadas para serem submetidas à coloração pelo método H.E. (LISON, L., 1960).

DESPARAFINAR: Dois banhos de xilol

xilol I - 5 minutos

xilol II - 5 minutos

HIDRATAÇÃO: Álcool etílico em ordem crescente, até chegar na água

álcool absoluto (100%) - 3 minutos

álcool a 90% - 3 minutos

álcool a 70% - 2 minutos

água corrente - 10 minutos

COLORAÇÃO:

hematoxilina - 1 minuto

água corrente - 10 minutos

eosina - 3 minutos

A seguir as preparações sofreram nova desidratação e diafanização para montagem em Bálsamo do Canadá.

DESIDRATAÇÃO:

álcool a 70% - 2 minutos

álcool a 90% - 2 minutos

álcool absoluto (100%) - 2 minutos

álcool absoluto (100%) - 2 minutos

DIAFANIZAÇÃO: Dois banhos de xilol

xilol I - 2 minutos

xilol II - 2 minutos

MONTAGEM DA LÂMINA:

Meio de montagem: Bálsamo do Canadá

Secagem da lâmina: Estufa a 60°C durante 24 horas

Nas lâminas coradas e montadas foram observados e fotografados vários campos em microscópio Zeiss, com objetivas de 5x, 10x, 20x, e 40x. Também foi observada a morfometria, utilizando-se uma ocular de 10x, contendo no seu interior um retículo de Weibel com 25 pontos (WEIBEL, E.R., 1969). Este retículo foi projetado sobre os tecidos e contados os pontos em que incidiram os cortes histológicos. Estes procedimentos foram realizados utilizando-se a objetiva de 40x, totalizando um aumento final 400x. Foram contados 400 pontos por animal, totalizando 2400 pontos por grupo.

### **3.3.7.1 – CORAÇÃO**

As peças foram observadas e fotografadas em microscópio Zeiss, e dados morfométricos foram obtidos pela contagem de fibras musculares, seccionadas de maneira transversal e longitudinal.

### **3.3.7.2 - RINS**

Foram observadas e fotografadas, ao microscópio Zeiss, diferentes regiões do córtex renal de ratos. Dados morfométricos foram obtidos pela contagem de glomérulos e tubos contorcidos distais, totalizando um aumento final de 100x.

### **3.3.7.3 - CÉREBRO**

As peças foram observadas e fotografadas em microscópio Zeiss e foram analisadas secções transversais dos hemisférios cerebrais de rato em várias regiões, A porção cortical foi subdividida em seis camadas bem como a substância branca. Dados morfométricos foram obtidos a partir dos pontos que incidiram sobre os neurônios.

### **3.3.7.4 - GENITÁLIA ACESSÓRIA**

Foram retirados fragmentos de testículo e epididimo e também de ovário e tuba uterina. As peças foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (MICHALANY, J., 1980) e observadas ao microscópio óptico.

## **3.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os valores foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias, exceto para a DL<sub>50</sub>, onde foram indicados os limites fiduciais para probabilidade de 5%. As diferenças entre os grupos foram analisadas, através do programa Primer versão 1.0 da McGraw-Hill (1998). Foi feita a comparação de proporções (índices de fertilidade, gestação, viabilidade e lactação e proporção de machos e fêmeas), Qui-quadrado (índice de reabsorção) e teste "t" de Student para amostras não pareadas (relação prole/mãe, peso, valores de bioquímica, hematologia e morfometria). O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre  $\geq$  a 5%.

### 3.9 - REAGENTES:

álcool Etilico P.A.	Merck
ácido acético glacial P.A.	Vetec
ácido pícrico	Merck
coulter clenx	Coulter
eosina	Sigma
éter Sulfúrico	reagen
formaldeído Puro	Reagen
hematoxilina	Sigma
isoton 3	Coulter
kits bioquímica	Wiener Lab
lyse	Coulter
NaCl P.A.	Reagen
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Reagen
scater pak	Coulter
xilol P.A.	MERCK

## **IV RESULTADOS**

### **4.1 - PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

#### **4.1.1 - OBSERVAÇÕES GERAIS**

A administração do EB (0,1 a 2,0g/kg) por via oral em camundongos e ratos não promoveu nenhuma alteração na atividade geral dos animais em relação ao grupo controle. Por outro lado, por via i.p. em camundongos o EB 0,1 e 0,25g/kg produziram ligeira redução da movimentação espontânea. Doses maiores 0,5 e 1,0g/kg induziram diminuição da movimentação espontânea e da frequência respiratória, sedação, passividade e contorções abdominais. Após 48h de observação 67% dos animais morreram. A análise macroscópica dos animais mortos, não demonstrou a presença de pontos hemorrágicos no coração e pulmão. O EB 2,0g/kg produziu sinais mais intensos. Em 48h de observação 100% dos animais morreram. Em ratos, nas mesmas doses anteriores observamos sinais similares aos descritos para camundongos, com cerca de 60 e 80% de mortes nas doses respectivamente de 1,0 e 2,0g/kg em 48h de observação.

#### **4.1.2 - TOXICIDADE AGUDA**

**Via Oral:** O EB nas doses de 0,5 a 4,0g/kg não produziu morte em camundongos e ratos de ambos os sexos por um período de até 14 dias de observação, dessa forma, não foi possível estimar o valor de DL<sub>50</sub> devido à impossibilidade de obter concentrações maiores (solubilidade do extrato).

**Via Intraperitoneal:** Por essa via, o valor estimado da DL<sub>50</sub> de 24h, obtido para ratos machos e fêmeas foi, respectivamente, 1,04 (0,98-1,09) e 0,63 (0,57-0,70) g/kg. Observe que as fêmeas foram 1,65 vezes mais sensíveis do que os machos.

### **4.1.3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EB SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTORA DE RATAS**

#### **4.1.3.1 - FÊMEA TRATADA COM EXTRATO BRUTO X MACHO NÃO TRATADO.**

Nossos resultados mostram que o tratamento das ratas durante 30 dias consecutivos com EB 0,5g/kg, v.o. não modificou o ganho de peso nos grupos controle e tratado respectivamente 9,6 e 10,6%: Início (controle = 229,2 ± 4,4g e tratado = 232,2 ± 7,3g) e final do tratamento (controle = 251,1 ± 6,4g e 256,7 ± 5,9g). Da mesma forma, não constatamos qualquer alteração na atividade geral incluindo consumo de ração e água das fêmeas tratadas durante o período de administração em relação ao grupo controle que recebeu apenas água.

No grupo controle (Tabela I), decorrido o período de gestação (cerca de 22 dias), as 6 ratas tiveram um total de 48 filhotes ou cerca de 8 filhotes por rata. Ao final do quarto dia não registramos mortes, mas até 21 dias (índice de lactação) registramos as mortes de 4 filhotes. No grupo tratado com EB 0,5g/kg, a duração da gestação foi similar à observada no grupo controle, as 6 fêmeas geraram no total 43 filhotes ou cerca de 7,1 filhotes por rata. Ao término do quarto dia não registramos mortes, até 21 dias (índice de lactação) observamos a morte de apenas um filhote. Cabe salientar que a análise macroscópica do animal não mostrou nenhuma alteração que pudesse ser correlacionada ao tratamento com EB. A atividade geral dos filhotes, avaliada após o 28º dia de vida, não mostrou qualquer alteração comportamental em relação ao grupo controle. Como pode ser observado na (Tabela I), nenhum dos parâmetros de reprodução foi modificado.

No grupo controle (Tabela II), 15 ratas, de um total de 20, procriaram um total de 151 filhotes ou cerca de 10 filhotes por rata. Ao final do quarto dia não observamos nenhuma morte, mas até o 21º dia contabilizamos 30 filhotes mortos, a análise desses animais não mostrou nenhuma alteração macroscópica. Os parâmetros de reprodução (Tabela II), mostram que não houve diferença estatística entre os grupos.

No período de tratamento com EB 1,0g/kg, não constatamos qualquer alteração na atividade geral das fêmeas, assim como, na duração da gestação ( $23 \pm 0,8$  dias) em relação ao grupo controle ( $22 \pm 0,7$  dias). As 8 ratas de um total de 10 procriaram no total 72 filhotes ou 9 filhotes por rata. Ao final do quarto dia, não observamos nenhuma morte, mas até o 21º dia, contabilizamos 12 filhotes mortos, cuja análise não mostrou nenhuma alteração macroscópica. Os 60 filhotes restantes não apresentaram diferença na atividade geral em relação ao grupo controle. Em duas ratas do grupo tratado e cinco do controle não observamos a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. As variáveis de reprodução estão expressos na tabela II.

**TABELA I:** Variáveis de reprodução obtidos através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: fêmea tratada (EB, 0,5g/kg/30dias, v.o.) x macho não tratado.

VARIÁVEIS	CONTROLE	TRATADO
<b>Prole/Mãe</b>	8,00 ± 1,10	7,10 ± 1,81
<b>Índice de Fertilidade</b> (ratas prenhas/ratas acasaladas)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
<b>Índice de Gestação</b> (% de fêmeas prenhas com fetos vivos)	100%	100%
<b>Índice de Viabilidade</b> (% de sobrevivida após 4 dias)	100%	100%
<b>Índice de Lactação</b> (% sobrevivida no 21 <sup>o</sup> d/n <sup>o</sup> de nascimento)	91,66%	97,68%
Massa corporal 1 <sup>o</sup> dia (g)	5,94 ± 0,42g	5,89 ± 0,80g
Massa corporal 28 <sup>o</sup> dia (g)	54,70 ± 1,70g	57,50 ± 1,50g
Proporção de machos	51,47%	53,85%
Proporção de fêmeas	48,53%	46,15%

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de 6 animais.

**TABELA II:** Variáveis de reprodução obtidos através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: fêmea tratada (EB, 1,0g/kg/30dias, v.o.) x macho não tratado.

<b>VARIÁVEIS</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>TRATADO</b>
<b>Prole/Mãe</b>	10,06 ± 0,63	9,00 ± 0,79
<b>Índice de Fertilidade</b> (ratas prenhas/ratas acasaladas)	15/20 (75%)	8/10 (80%)
<b>Índice de Gestação</b> (% de fêmeas prenhas com fetos vivos)	100%	100%
<b>Índice de Viabilidade</b> (% de sobrevivida após 4 dias)	100%	100%
<b>Índice de Lactação</b> (% sobrevivida no 21 <sup>o</sup> d/n <sup>o</sup> de nascimento)	80,14%	83,34%
Massa corporal 1 <sup>o</sup> dia (g)	7,10 ± 0,20	7,5 ± 0,20
Massa corporal 28 <sup>o</sup> dia (g)	61,45 ± 0,95	58,83 ± 1,04
Proporção de machos	52,42%	54,54%
Proporção de fêmeas	47,58%	45,46%

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de respectivamente 15 e 08 animais.

#### **4.1.4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO SUBAGUDO DO EB SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM RATAS PRENHAS**

##### **4.1.4.1 - TRATAMENTO DURANTE O PERÍODO DA GESTAÇÃO**

Nossos dados mostram que o ganho de peso ao final do período de gestação (cerca de 22 dias) no grupo tratado (EB 0,5 e 1,0g/kg), respectivamente, 19,07% (início:  $213,48 \pm 5,64$ g e final:  $254,21 \pm 9,15$ g) e 20,67% (início:  $208,25 \pm 6,40$ g e final:  $251,31 \pm 8,04$ g) não foi significativamente diferente em relação ao grupo controle 18,93% (início:  $220,38 \pm 4,80$ g e final:  $262,10 \pm 6,30$ g). Em adição, a atividade geral não foi modificada.

No grupo controle, decorrido o período de gestação, as 11 ratas, de um total de 14, fecundaram e tiveram um total de 94 filhotes ou cerca de 8,5 filhotes por rata. Ao final do quarto dia de vida não registramos nenhuma morte.

Nos grupos tratados com EB 0,5 e 1,0g/kg, a duração da gestação foi similar à observada com o grupo controle. Nesses grupos, respectivamente, 13 e 7 fêmeas, de um total de 14 e 10, fecundaram e tiveram no total 126 e 73 filhotes ou cerca de 9,7 e 10,4 filhotes por rata. Não registramos nenhuma morte ao final de quatro dias de observação em ambos os grupos. Entretanto, ao final de 21 dias, observamos, respectivamente, a morte de 13 e 5 filhotes. A análise desses animais não mostrou nenhuma alteração macroscópica. Os parâmetros de reprodução não diferiram estatisticamente do grupo controle (Tabela III).

**TABELA III:** Variáveis reprodutivas de ratas tratadas durante a gestação (cerca de 22 dias) com EB 0,5g/kg/dia, v.o.

VARIÁVEIS	CONTROLE	EB 0,5g/kg	EB 1,0g/kg
<b>Prole/Mãe</b>	8,55 ± 0,50	9,69 ± 0,64	10,43 ± 1,28
<b>Índice de Fertilidade</b> (ratas prenhas/ratas acasaladas)	11/14 (79%)	13/14(93%)	7/10 (70%)
<b>Índice de Gestação</b> (% de fêmeas prenhas com fetos vivos)	100%	100%	100%
<b>Índice de Viabilidade</b> (% de sobrevivida após 4 dias)	100%	100%	100%
<b>Índice de Lactação</b> (% sobrevivida no 21 <sup>o</sup> d/n <sup>o</sup> de nascimento)	100%	89,69%	93,15%
Massa corporal 1 <sup>o</sup> dia	7,50 ± 0,20	6,98 ± 0,16	6,90 ± 0,20
Massa corporal 28 <sup>o</sup> dia	58,90 ± 0,70	57,17 ± 1,24	59,39 ± 1,51
Proporção de machos	42,60%	43,89%	38,67%
Proporção de fêmeas	57,40%	56,11%	61,33%

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de respectivamente: grupo controle, 0,5g/kg e 1,0g/kg.

#### **4.1.4.2 - TRATAMENTO COM EB DURANTE AS DIFERENTES FASES DA GESTAÇÃO.**

Após laparotomia realizada antes da gestação a termo nos grupos durante a fase da fecundação (1º ao 7º dia) observamos, implantação uniforme com valor médio de 8,66 e 8,33, respectivamente, para os grupos controle e tratado com EB. Todos os caracteres embrionários estavam presentes em ambos os grupos, sem interferência da fertilidade nessa fase.

Na fase secundária (embriogênese, 8º ao 14º dia) o valor médio do número de implantação para os grupos controle e tratado foi igual a 8,0. Não houve diferença estatística (qui-quadrado) no índice de reabsorção entre os grupos controle e tratado. A diferenciação histológica e fisiológica apresentou-se normal.

Na fase fetal (gestação a termo, 15º ao 21º dia), a laparotomia exploratória demonstrou ausência de diferença estatística no índice de reabsorção entre os grupos controle e tratado. Os fetos de ambos os grupos se desenvolveram sem deformidade nas implantações ao término do ciclo gestacional. Ao exame, não foram encontrados fetos com polidactilia, evisceração fetal, fenda labial ou exoftalmia. O útero foi examinado para verificação dos sítios de implantação ou constatação de feto morto, o que não aconteceu.

O sistema de implantação se distribuiu regularmente com útero bicôrnio, ausência de má formação congênita com placenta homocorial em cada feto. O valor médio do número de implantação para os grupos controle e tratado foi respectivamente, 10,7 e 10,0 (Tabela IV).

**TABELA IV:** Valores de implantação e índice de reabsorção após administração do EB de *Mentha crispa* (0,5g/kg, v.o.) nos grupos controle e tratado, durante as fases de fecundação (1º ao 7º dia), embriogênica (8º ao 14º dia) e fase fetal (15º ao 21º dia).

<b>1º ao 7º dia</b>	<b>IMPLANTAÇÃO</b>	<b>REABSORÇÃO</b>	<b>ÍNDICE DE REABSORÇÃO</b>
controle	52	0	0
tratado	50	0	0

<b>8º ao 14º dia</b>	<b>IMPLANTAÇÃO</b>	<b>REABSORÇÃO</b>	<b>ÍNDICE DE REABSORÇÃO</b>
controle	48	0	0
tratado	48	2	4,17

<b>15º ao 21º dia</b>	<b>IMPLANTAÇÃO</b>	<b>REABSORÇÃO</b>	<b>ÍNDICE DE REABSORÇÃO</b>
controle	64	0	0
tratado	60	3	5,0

Índice de reabsorção = nº de reabsorção x 100/ nº de implantação.

#### **4.1.5 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EB SOBRE A FERTILIDADE DE RATOS**

O tratamento dos ratos durante 30 dias consecutivos com EB 0,5 e 1,0g/kg não modificou a atividade geral dos animais em relação ao grupo controle.

No grupo controle, decorrido o período de gestação, 6 fêmeas acasaladas com machos não tratados geraram um total de 48 filhotes ou cerca de 8 filhotes por rata. Ao final do quarto dia registramos a morte de 6 filhotes até o 21 dia não registramos mais mortes de filhotes. No grupo tratado das fêmeas acasaladas com machos tratados com EB 0,5g/kg, a duração da gestação foi semelhante a obtida no grupo controle, as 6 fêmeas geraram no total 56 filhotes ou cerca de 9,3 filhotes por rata. Ao final do quarto dia não observamos nenhuma morte, mas aos 21 dias observamos 7 mortes. A análise macroscópica dos animais não mostrou nenhuma alteração que pudesse ser correlacionada ao tratamento com EB. A atividade geral da prole avaliada após o 28º dia de vida não mostrou qualquer alteração comportamental em relação ao grupo controle. A Tabela V mostra que nenhuma das variáveis reprodutivas foi estatisticamente diferente do grupo controle.

No grupo controle, 15 ratas de um total de 20, geraram um total de 151 filhotes ou cerca de 10 filhotes por rata. Ao final do quarto dia não observamos nenhuma morte, até o 21 dia contabilizamos 30 filhotes mortos, a análise desses animais não mostrou nenhuma alteração macroscópica.

Decorrido o tempo de gestação, o qual foi similar ao do grupo controle, 16 ratas, de um total de 20 acasaladas com machos tratados EB 1,0g/kg, conceberam no total 135 filhotes ou 8,43 por rata. Ao final do quarto dia não observamos nenhuma morte, até o 21 dia registramos 22 mortes na prole. A análise macroscópica dos animais não mostrou nenhuma alteração que pudesse ser correlacionada com o tratamento do EB.

Os 113 filhotes restantes apresentaram desenvolvimento normal sem alteração na atividade geral quando comparado ao grupo controle. Na (tabela VI), pode ser observado que os parâmetros de reprodução não foram estatisticamente diferentes do grupo controle.

**TABELA V:** Variáveis de reprodução obtidas através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: macho tratado (EB, 0,5g/kg/30dias,v.o.) x fêmea não tratada.

VARIÁVEIS	CONTROLE	TRATADO
<b>Prole/Mãe</b>	8,00 ± 0,82	9,33 ± 0,93
<b>Índice de Fertilidade</b> (ratas prenhas/ratas acasaladas)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
<b>Índice de Gestação</b> (% de fêmeas prenhas com fetos vivos)	100%	100%
<b>Índice de Viabilidade</b> (% de sobrevivida após 4 dias)	87,50%	100%
<b>Índice de Lactação</b> (% sobrevivida no 21 <sup>o</sup> d/n <sup>o</sup> de nascimento)	87,50%	87,50%
Massa corporal 1 <sup>o</sup> dia (g)	5,60 ± 0,36	5,85 ± 0,60
Massa corporal 21 <sup>o</sup> dia (g)	47,50 ± 1,70	44,7 ± 0,83
Proporção de machos	47,62%	48,55%
Proporção de fêmeas	52,48%	51,45%

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de 6 animais.

**TABELA VI:** Variáveis de reprodução obtidas através do acasalamento entre ratos Wistar do grupo controle e do grupo tratado: macho tratado (EB, 1,0g/kg/30dias,v.o.) x fêmea não tratada.

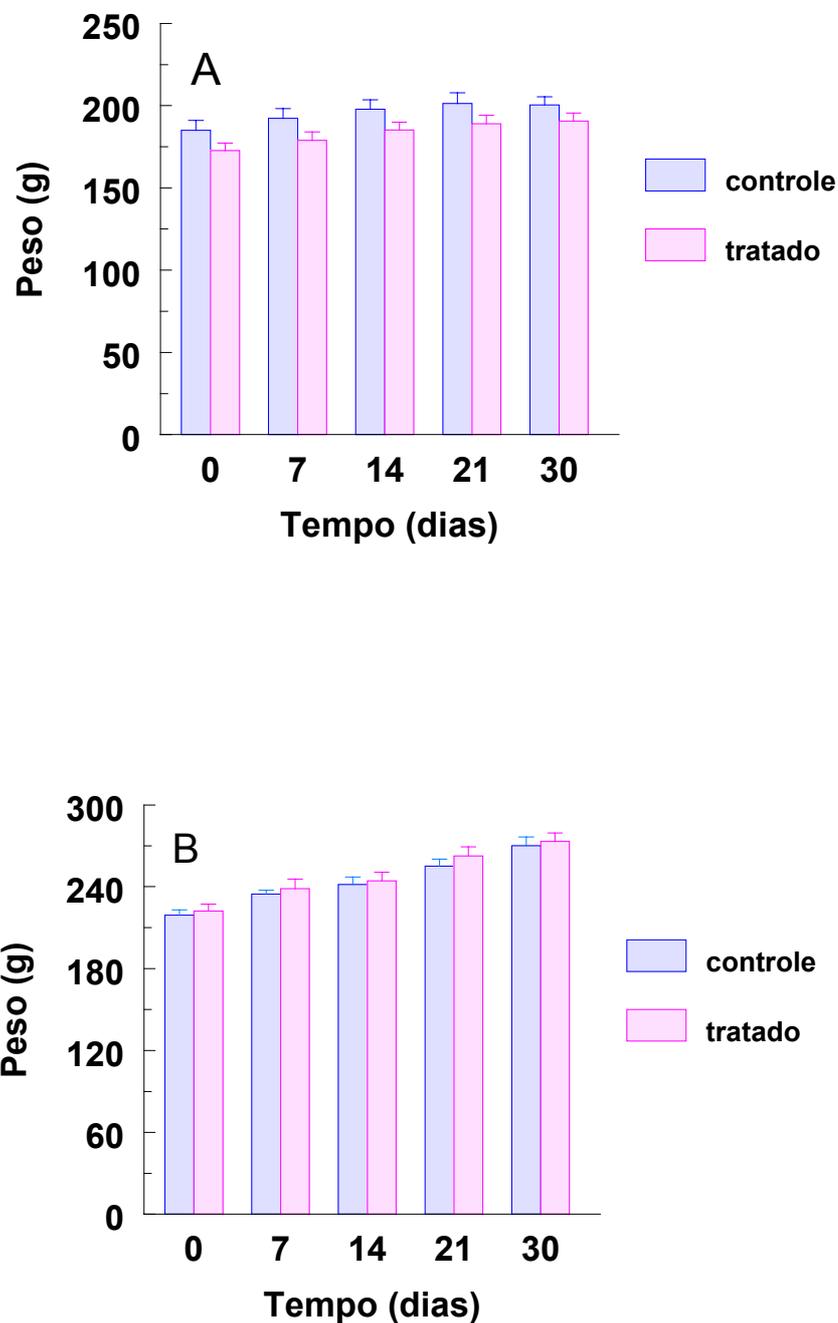
<b>VARIÁVEIS</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>TRATADO</b>
<b>Prole/Mãe</b>	10,06 ± 0,63	8,43 ± 0,88
<b>Índice de Fertilidade</b> (ratas prenhas/ratas acasaladas)	15/20 (75%)	16/20 (80%)
<b>Índice de Gestação</b> (% de fêmeas prenhas com fetos vivos)	100%	100%
<b>Índice de Viabilidade</b> (% de sobrevivida após 4 dias)	100%	100%
<b>Índice de Lactação</b> (% sobrevivida no 21ºd/nº de nascimento)	80,14%	83,71%
Massa corporal 1º dia (g)	7,10 ± 0,20	7,00 ± 0,09g
Massa corporal 28º dia (g)	61,45 ± 0,95	61,39 ± 1,39g
Proporção de machos	52,42%	54,9%
Proporção de fêmeas	47,58%	45,1%

Os valores representam as médias ± erro padrão das médias de 15-16 animais.

#### **4.1.6 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1g/kg) SOBRE A MASSA CORPORAL DOS RATOS ADULTOS E DOS PRINCIPAIS ÓRGÃOS.**

Durante o período de tratamento, os grupos experimentais não apresentaram alterações na atividade geral ou do consumo de água e ração em relação aos grupos controles. O ganho ponderal de peso dos grupos controles (macho 23,3% e fêmea 8,3%) e grupos tratados (macho 22,9% e fêmea 10,5%) não diferiram estatisticamente (Figura 1, A e B).

Da mesma forma, não observamos diferenças estatisticamente significativas no peso úmido dos órgãos para os ratos de ambos os sexos, entre os grupos controle e tratado como pode ser observado na (Tabela VII).



**FIGURA 1:** Valores de massa corporal após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB 1,0g/kg de *Mentha crispata* pela via oral em ratos fêmeas (A) e machos (B) adultos.

**TABELA VII:** Massas dos órgãos (mg)/100g de peso de animal. após tratamento prolongado, durante 30 dias consecutivos, com 1,0g/kg de EB pela via oral, respectivamente, em ratos de ambos os sexos.

<b>MACHO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>TRATADO</b>
Coração	412 ± 21	377 ± 42
Fígado	3274 ± 132	2983 ± 181
Baço	348 ± 75	306 ± 56
Rim	707 ± 51	701 ± 32
Cérebro	917 ± 72	797 ± 64
Pulmão	770 ± 105	741 ± 138
Adrenal	30,0 ± 5,0	29,0 ± 4,0
Ducto deferente	59 ± 3,0	64,0 ± 5,6
Testículo	1450 ± 60	1502 ± 33

<b>FÊMEAS</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>TRATADO</b>
Coração	414 ± 20	367 ± 31
Fígado	3362 ± 161	3068 ± 210
Baço	238 ± 11	233 ± 15
Rim	883 ± 31	748 ± 62
Cérebro	686 ± 83	712 ± 42
Pulmão	708 ± 121	717 ± 152
Adrenal	19,0 ± 3,3	22,0 ± 3,0
Ovário	0,47 ± 0,3	0,40 ± 0,4
Útero	386 ± 133	378 ± 126

Obs: Os valores representam as médias ± e.p.m. de 10 animais.

Não foi observada nenhuma alteração macroscópica dos órgãos.

#### 4.1.7 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1G/KG) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO EM RATOS ADULTOS DE AMBOS OS SEXOS.

O tratamento prolongado com EB não modificou os perfis bioquímico e hematológico dos ratos em relação aos grupos controle, conforme mostrados nas tabelas VIII, IX, X, e XI.

**TABELA VIII:** Valores dos parâmetros bioquímicos após tratamento prolongado, durante 30 dias consecutivos, com EB 1g/kg de *Mentha crispera* pela via oral, em ratos machos adultos.

PARÂMETRO	CONTROLE	TRATADO
Glicose <sup>p</sup> (mg/dl)	132,6 ± 2,4	134,3 ± 3,8
Creatinina <sup>s</sup> (mg/dl)	0,36 ± 0,03	0,32 ± 0,05
Aspartato-aminotransferase <sup>s</sup> (U/L)	124,6 ± 1,8	133,8 ± 6,5
Alanina-aminotransferase <sup>s</sup> (U/L)	64,0 ± 4,1	69,6 ± 1,0
Colesterol total <sup>s</sup> (mg/dl)	48,3 ± 3,0	52,4 ± 1,4
Triglicerídeos <sup>s</sup> (mg/dl)	56,4 ± 4,8	69,1 ± 10,5
Fosfatase alcalina <sup>s</sup> (U/L)	301,4 ± 45,4	319,6 ± 29,5
Bilirrubina total <sup>s</sup> (mg/dl)	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,02
Bilirrubina direta <sup>s</sup> (mg/dl)	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,02
Bilirrubina indireta <sup>s</sup> (mg/dl)	0,10 ± 0	0,10 ± 0
Proteínas totais <sup>s</sup> (g/dl)	6,73 ± 0,09	6,16 ± 0,05
Albumina <sup>s</sup> (g/dl)	3,86 ± 0,10	4,38 ± 0,04
Globulina <sup>s</sup> (g/dl)	2,86 ± 0,19	1,78 ± 0,04
Uréia <sup>u</sup> (mg/dl)	6800 ± 590	5110 ± 450
Creatinina <sup>u</sup> (mg/dl)	51,0 ± 5,3	67,3 ± 3,9
Ácido úrico <sup>u</sup> (mg/dl)	26,4 ± 3,6	30,6 ± 5,1

Obs: 1- Os valores representam as médias ± e.p.m. de 7 animais.

2- (p) indica plasma, (s) indica soro e (u) indica urina.

3- Aspartato-aminotransferase = transaminase glutâmico-oxalacética (TGO).

**TABELA IX:** Valores dos parâmetros bioquímicos, após tratamento prolongado, durante 30 dias consecutivos, com EB 1g/kg de *Mentha crispera* pela via oral, em ratas adultas.

<b>PARÂMETRO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>TRATADO</b>
Glicose <sup>p</sup> (mg/dl)	111,3 ± 4,3	119,0 ± 5,7
Creatinina <sup>s</sup> (mg/dl)	0,37 ± 0,05	0,42 ± 0,03
Aspartato-aminotransferase <sup>s</sup> (U/L)	123,6 ± 7,3	116,8 ± 6,5
Alanina-aminotransferase <sup>s</sup> (U/L)	55 ± 1,0	49 ± 5,7
Colesterol total <sup>s</sup> (mg/dl)	88,4 ± 8,0	82,0 ± 2,8
Triglicerídeos <sup>s</sup> (mg/dl)	81,5 ± 11,1	52,4 ± 5,9
Fosfatase alcalina <sup>s</sup> (U/L)	295,2 ± 25,8	271,4 ± 17,5
Bilirrubina total <sup>s</sup> (mg/dl)	0,20 ± 0	0,20 ± 0
Bilirrubina direta <sup>s</sup> (mg/dl)	0,10 ± 0	0,10 ± 0
Bilirrubina indireta <sup>s</sup> (mg/dl)	0,10 ± 0	0,10 ± 0
Proteínas totais <sup>s</sup> (g/dl)	6,36 ± 0,07	7,16 ± 0,15
Albumina <sup>s</sup> (g/dl)	4,54 ± 0,06	4,13 ± 0,07
Globulina <sup>s</sup> (g/dl)	1,82 ± 0,07	3,03 ± 0,11
Uréia <sup>u</sup> (mg/dl)	3600 ± 287	4000 ± 350
Creatinina <sup>u</sup> (mg/dl)	39,6 ± 7,5	55 ± 12
Ácido úrico <sup>u</sup> (mg/dl)	8,66 ± 1,0	7,0 ± 0,9

Obs: 1- Os valores representam as médias ± e.p.m. de 7 animais.  
 2- (p) indica plasma, (s) indica soro e (u) indica urina.  
 3- Aspartato-aminotransferase = transaminase glutâmico-oxalacética (TGO).

**TABELA X:** Valores dos parâmetros hematológicos, após tratamento prolongado, durante 30 dias consecutivos, com EB (1g/kg) pela via oral, em ratos machos adultos.

	<b>CONTROLE</b>	<b>TRATADO</b>
eritrócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8,32 ± 0,12	7,85 ± 0,36
hemoglobina (g%)	15,80 ± 0,30	16,00 ± 0,20
hematócrito (%)	47,20 ± 1,41	47,62 ± 0,72
VCM (fl)	57,00 ± 1,50	61,20 ± 3,00
HCM (pg)	19,00 ± 0,50	20,80 ± 1,00
CHCM (g/dl)	33,70 ± 0,30	33,80 ± 0,20
leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	8,13 ± 0,94	9,04 ± 0,68
Bastonetes (%)	0	0
segmentados (%)	15,44 ± 3,73	12,67 ± 1,41
eosinófilos (%)	0,64 ± 0,28	0,47 ± 0,25
basófilos (%)	0	0
linfócitos típicos (%)	81,71 ± 10,23	84,33 ± 6,61
linfócitos atípicos (%)	0	0
monócitos (%)	2,21 ± 1,06	2,53 ± 0,33

Os valores representam as médias ± erro padrão de 7 animais.

Série eritrocitária: Grupo controle e tratado apresentam normocitose e normocromia (7/7).

Série branca: Grupo controle - leucócitos morfológicamente conservados (7/7). Ausência de eosinófilos ao estudo da lâmina (1/7).

Série Plaquetínea: Grupos Controle e tratado aparentemente normais em número e morfologia (7/7).

VCM: Volume Corpuscular Média

HCM : Hemoglobina Corpuscular Média

CHCM : Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

**TABELA XI:** Valores dos parâmetros hematológicos após tratamento prolongado durante 30 dias consecutivos com EB (1g/kg) pela via oral em ratos fêmeas adultas.

	<b>CONTROLE</b>	<b>TRATADO</b>
eritrócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ )	7,45 ± 0,17	7,28 ± 0,14
hemoglobina (g%)	14,86 ± 0,30	13,10 ± 1,33
hematócrito (%)	42,46 ± 1,40	41,52 ± 0,91
VCM (fl)	56,66 ± 0,54	56,80 ± 0,65
HCM (pg)	20,00 ± 0,47	18,20 ± 2,06
CHCM (g/dl)	35,30 ± 0,72	31,60 ± 3,49
leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	6,23 ± 0,42	7,59 ± 0,13
Bastonetes (%)	0	0
segmentados (%)	14,00 ± 2,29	17,30 ± 3,84
eosinófilos (%)	0	0
basófilos (%)	0	0
linfócitos típicos (%)	80,07 ± 6,27	78,79 ± 13,14
linfócitos atípicos (%)	0,38 ± 0,31	0,05 ± 0,04
monócitos (%)	5,55 ± 0,71	3,86 ± 0,92

Os valores representam as médias ± erro padrão de 7 animais.

Série eritrocitária: Grupo controle - normocitose e normocromia (7/7).  
Grupo tratado - discreta policromasia (1/7).

Série branca: Grupo controle - leucócitos morfologicamente conservados (7/7).  
Ausência de eosinófilos ao estudo da lâmina (1/7).

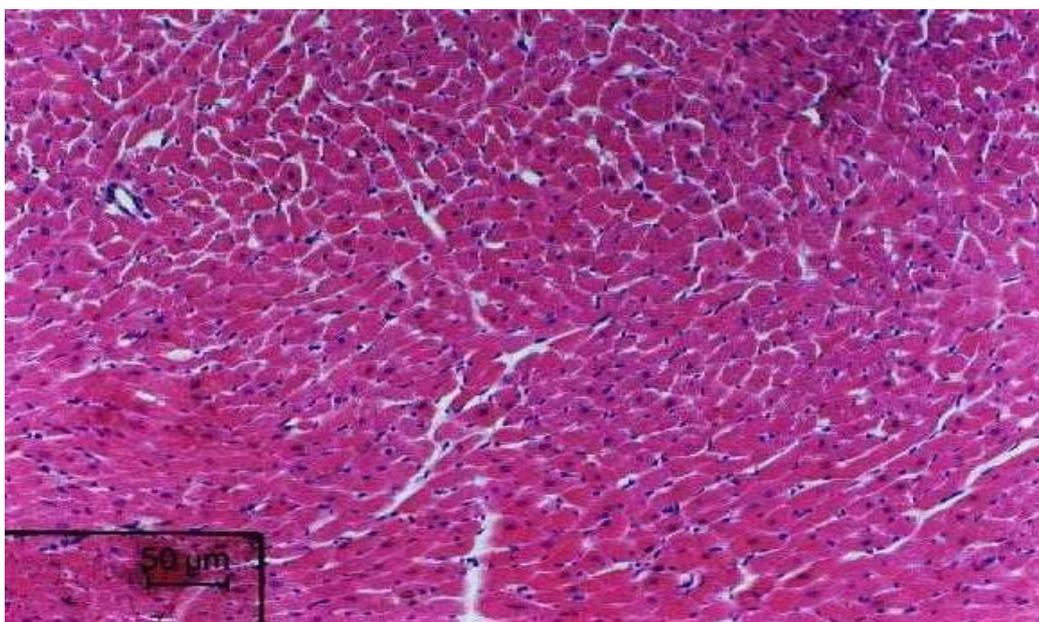
Série plaquetínea: Grupos controle e tratado aparentemente normais em número e morfologia (7/7).

## **4.1.8 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA DO EB (1g/kg) SOBRE A MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DOS ÓRGÃOS.**

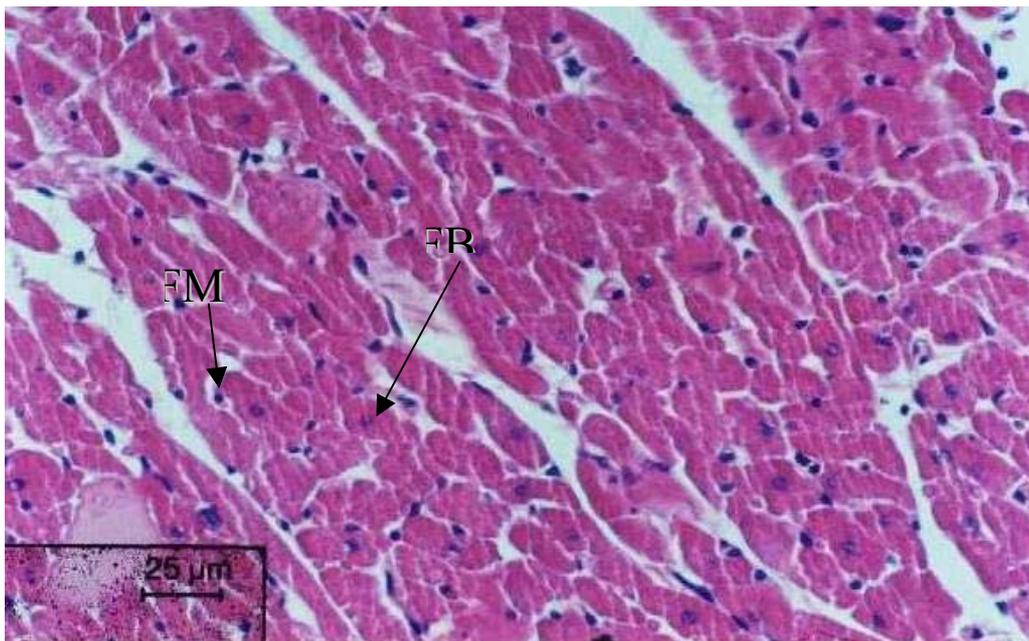
### **4.1.8.1 – CORAÇÃO**

#### **4.1.8.1.1- DADOS MORFOLÓGICOS**

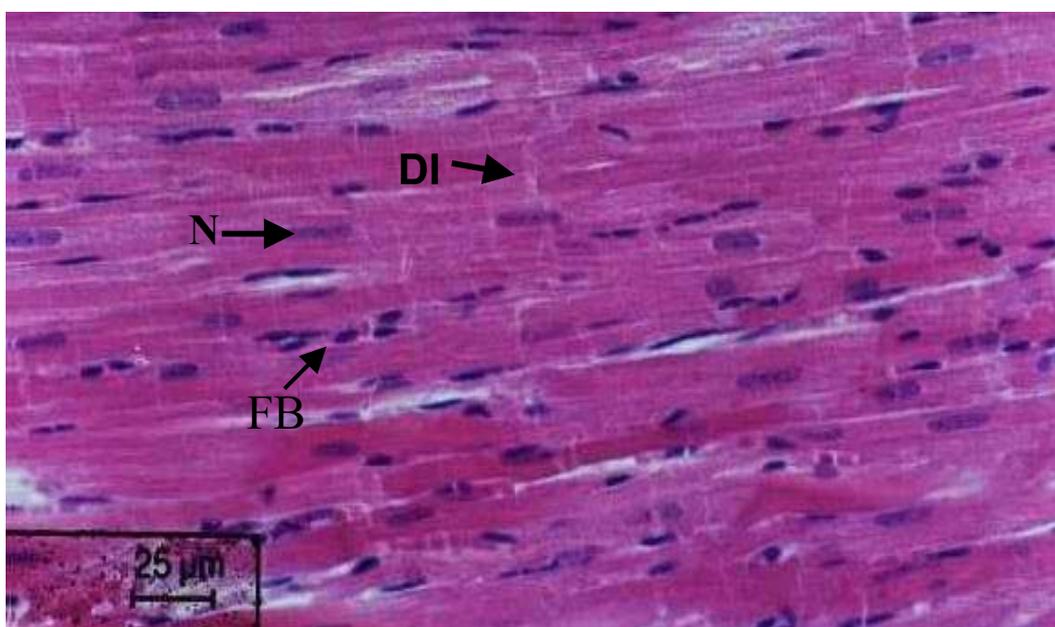
Em nosso estudo, observamos que em cortes transversais de fibras musculares do miocárdio de ratos, após tratamento durante 30 dias com EB, apresentam-se: com circunferência normal; núcleos localizados centralmente, levemente eucromático; o citoplasma é acidófilo com miofibrilas também seccionadas transversalmente (Figura 2 e 3). Em cortes longitudinais, os núcleos localizados centralmente mostram-se bem ovalados em discos intercalares e apresentam-se com disposição normal (Figura 4).



**FIGURA 2:** Fotomicrografia (Escala 50 $\mu$ m) de corte histológico transversal de fibras musculares do miocárdio de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o.). Notar a integridade do tecido muscular estriado cardíaco (coloração HE).



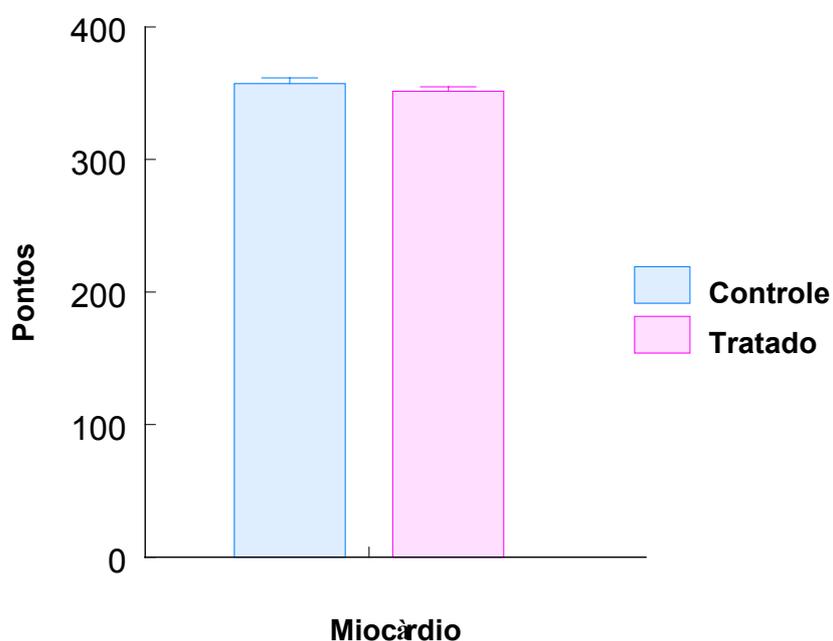
**FIGURA 3:** Fotomicrografia (Escala 25μm) de corte transversal do miocárdio de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg). Visualizar as fibras musculares, bem como a posição dos núcleos localizados centralmente nas células (FM). Fibroblastos (FB), (coloração HE).



**FIGURA 4:** Fotomicrografia (Escala 25μm) de corte longitudinal de fibras musculares do miocárdio de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o). Observar núcleos localizados centralmente (N) e discos intercalares (seta). (F), Fibroblastos (Coloração HE ).

#### 4.1.8.1.2 - DADOS MORFOMÉTRICOS:

Utilizando um retículo de WEIBEL com 25 pontos para a avaliação morfométrica do miocárdio (Figura 5) de ratos submetidos a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o.). A análise morfométrica mostrou que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle ( $375,2 \pm 4,57$ ) e tratado ( $352,5 \pm 3,37$ ).



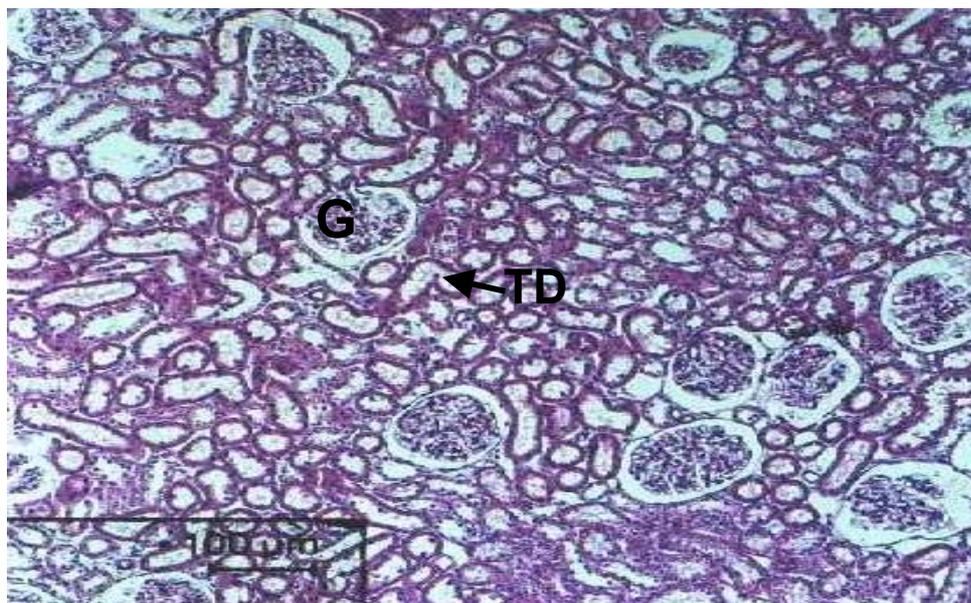
**FIGURA 5:** Média da morfometria de fibras musculares miocárdicas de ratos submetidos a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o.).

## 4.1.8.2- RINS

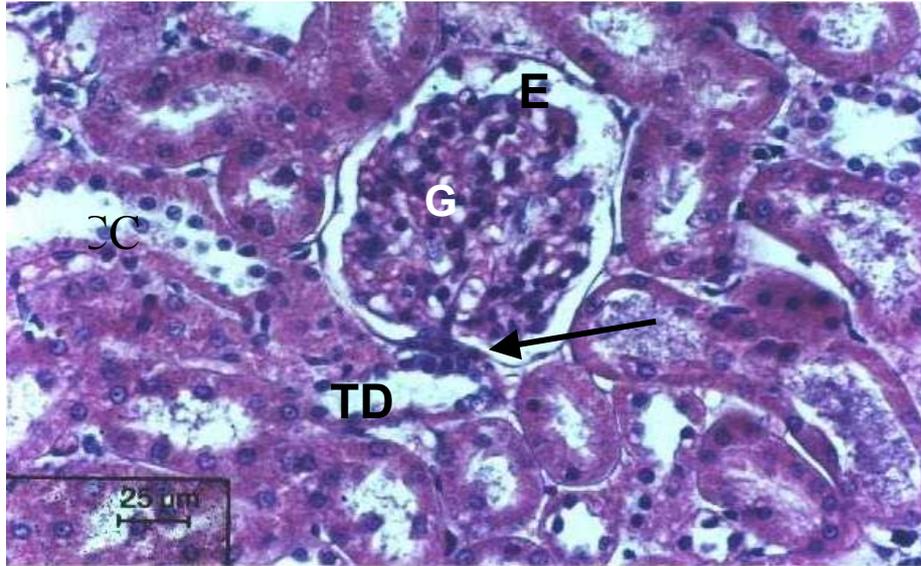
### 4.1.8.2.1 - DADOS MORFOLÓGICOS

Nosso estudo demonstrou que a região cortical do rim de ratos submetidos a tratamento crônico com o EB (1g/kg), apresenta glomérulos e túbulos contorcidos distais com concentração e disposição celular normal (Figura 6).

Analisamos mais detidamente os túbulos contorcidos distais e glomérulos. Os túbulos apresentam epitélio simples cúbico, com núcleo central (Figura 7). Os glomérulos apresentam alças capilares centrais associadas à cápsula de Bowman (Figura 9). O folheto parietal apresenta células pavimentosas simples com núcleo achatado e heterocromático. O espaço glomerular apresenta-se entre as alças capilares e o folheto parietal da cápsula de bowman (Figura 7).



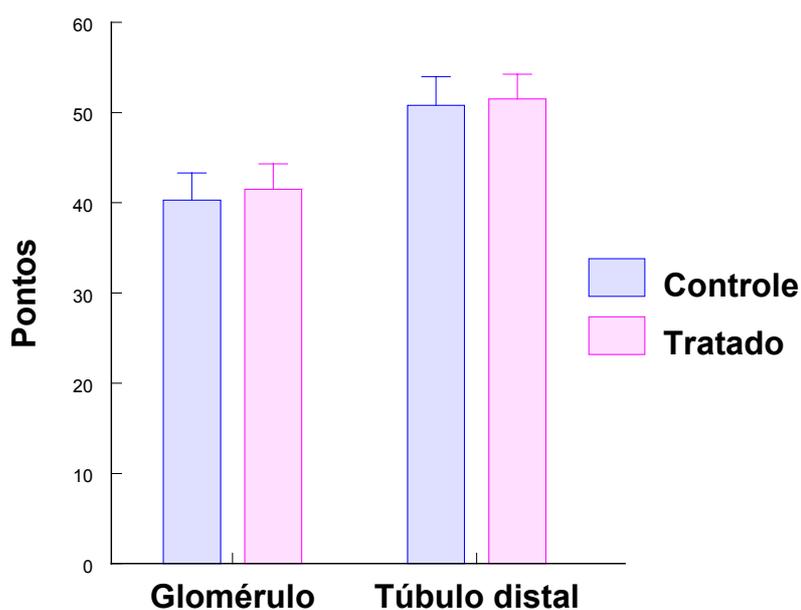
**FIGURA 6:** Fotomicrografia (Escala 100µm) de corte transversal da região cortical de rim de rato submetido a tratamento prolongado com o EB (1g/kg, v.o, por 30 dias). Evidenciar disposição normal de glomérulos (G) e tubos contorcidos distais (TD) (Coloração HE).



**FIGURA 7:** Fotomicrografia (Escala 25µm) de corte transversal da região cortical de rim de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o). Presença de células cúbicas (CC) e núcleos centrais nos túbulos contorcidos distais (TD) e (G) glomérulos. Visualizar disposição de células planas do epitélio simples pavimentos presentes na cápsula de Bowman (seta). Observar também, E: espaço glomerular (Coloração- HE).

#### 4.1.8.2.2 - DADOS MORFOMÉTRICOS

A análise quantitativa da contagem de glomérulo (G) e túbulo contorcido distal do córtex renal mostrou que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle (G = 40,30 ± 3,0 e TCD = 50,80 ± 3,13 ) e tratado (G = 41,50 ± 2,81 e TCD = 51,50 ± 2,77).



**FIGURA 8:** - Resultados da morfometria da região cortical do rim de ratos submetidos a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o), utilizando um retículo de WEIBEL com 25 pontos. Foram analisados 400 pontos por animal e contados os pontos que incidiram sobre glomérulos e tubos contorcidos distais dessas regiões.

### **4.1.8.3 - CÉREBRO:**

#### **4.1.8.3.1 - DADOS MORFOLÓGICOS**

Foram analisadas secções transversais dos hemisférios cerebrais de rato em várias regiões, as quais se apresentaram subdivididas estruturalmente em uma região cortical mais escura e uma região medular mais clara.

A porção cortical apresentou-se subdividida em seis camadas, que da superfície em direção à camada medular mostrou as seguintes características:

A primeira camada mostrou poucos corpos celulares de neurônios, os quais aparecem mais alongados e correm paralelamente à superfície do córtex cerebral. Outros núcleos menores mais arredondados e heterocromáticos aparecem entre os corpos celulares de neurônios e evidenciam características de células neurogliais. Entre os núcleos basófilos desta camada aparece uma região mais acidófila, rica em fibras amielínicas e prolongamentos de células nervosas e gliais (Figura 9).

A segunda camada apresenta uma maior condensação de corpos celulares. Estas células são pequenas e apresentaram formato piramidal ou estrelado. Quando piramidais, o vértice da pirâmide comumente é voltado para a superfície cortical. Quando estreladas, o corpo celular apresenta várias projeções citoplasmáticas que partem radialmente para todos os lados. Entretanto, nesta camada, as células ainda são pequenas. Entre os corpos celulares, um neurópilo acidófilo, constituído por prolongamentos dendríticos e fibras nervosas dispersas está presente (Figura 10).

A terceira camada apresenta corpos celulares de células piramidais (Figura 11), porém maiores que os da segunda camada. Células neurogliais pequenas estão presentes. Substância intercelular acidófila, rica em fibras e prolongamentos dendríticos separam estas células.

Na quarta camada, ocorre também a presença de células estreladas na mesma forma como na segunda camada, porém todas estão mais densamente agrupadas; o neurópilo é menos extenso.

Na quinta camada, aparecem células piramidais muito grandes, maiores que nas camadas descritas anteriormente. Também são observadas células poligonais e estreladas menores em número que as piramidais (Figura 12).

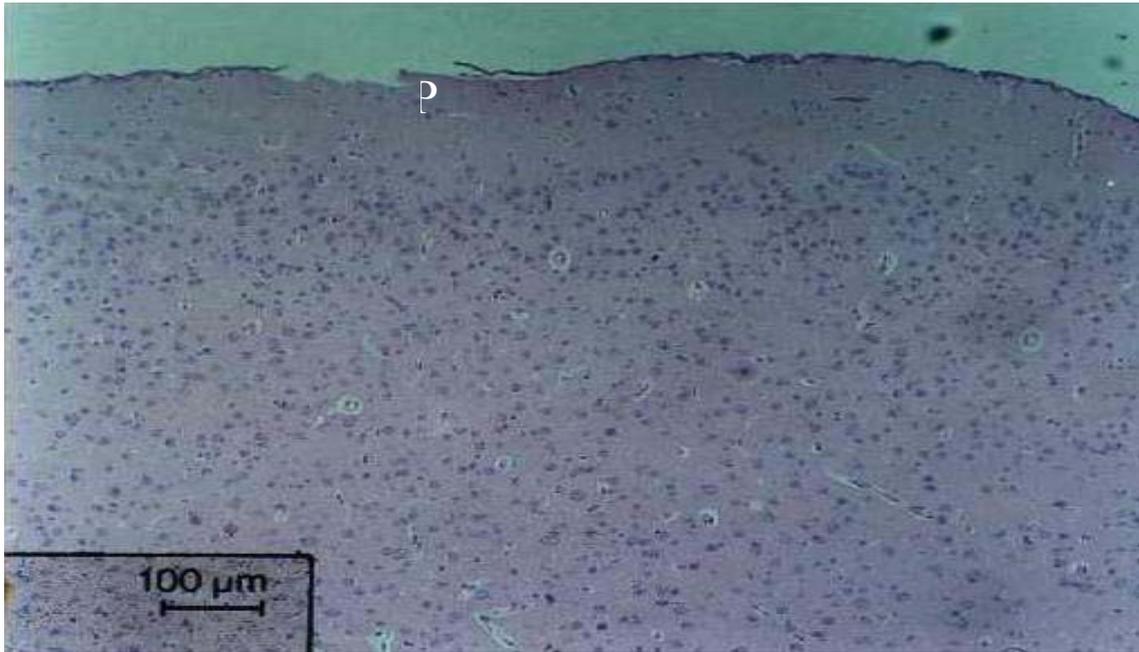
Na sexta camada, ocorre a presença de corpos celulares com variadas formas. Encontramos células piramidais, fusiformes, estreladas e globosas. Células gliais menores se confundem entre as mesmas. Uma substância intercelular rica em fibras nervosas e prolongamentos celulares separam as células, ao mesmo tempo que se associa adjacientemente com a substância branca.

Células neurogliais estão dispersas tanto na substância branca quanto na cinzenta, e apresentam uma variação em tamanho, forma e densidade de coloração nuclear.

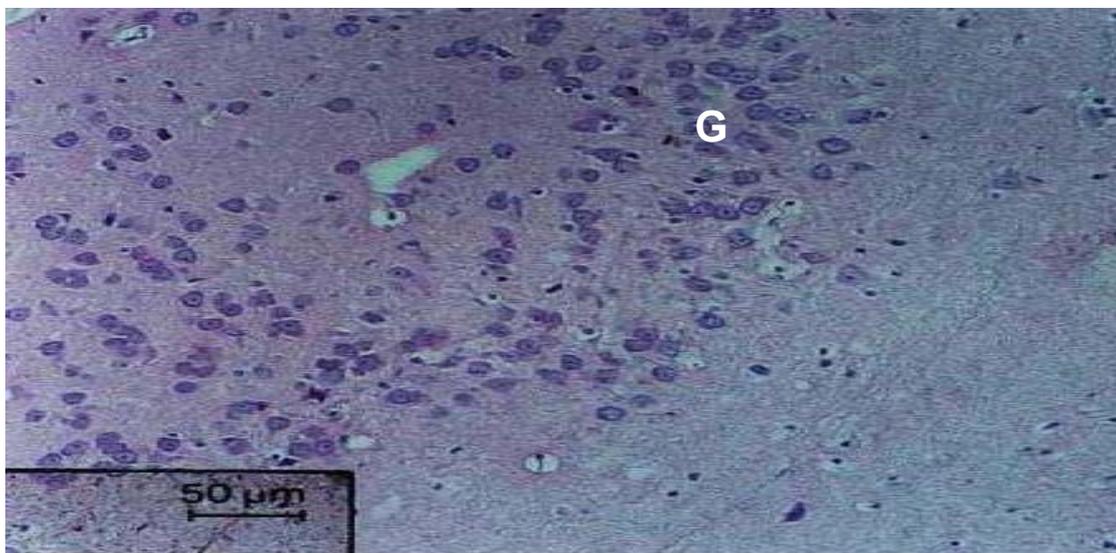
Abaixo da região cortical, uma outra região rica em axônios mielínicos caracteriza substância branca. Na mesma encontramos células pequenas, de núcleo ora arredondado, ora achatado, dispersos. Estas células são características de elementos neurogliais, não sendo observado halo citoplasmático ao redor do núcleo das mesmas.

Periféricamente, envolvendo todo o córtex cerebral, uma camada de tecido conjuntivo frouxo é evidente e está intimamente associada ao tecido nervoso. Apresenta arteríolas de pequeno porte e capilares que mergulham em direção ao conjuntivo que invade o interior da massa nervosa formando pequenos septos.

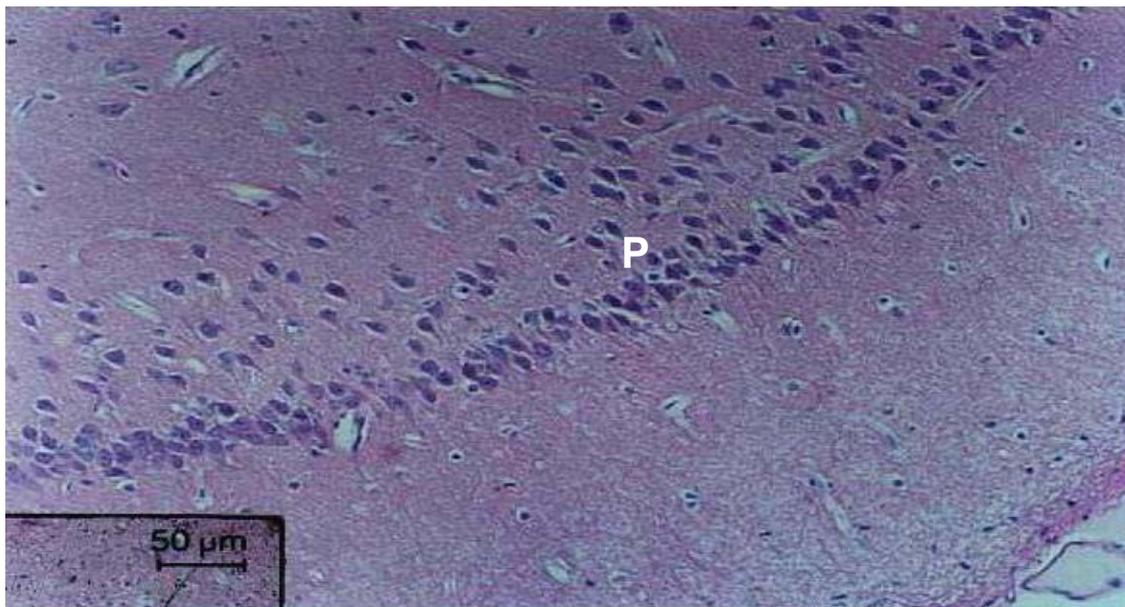
Estas características morfológicas foram observadas tanto nos grupos tratados (machos e fêmeas) indistintamente, como no grupo controle. Portanto, não encontramos diferenças morfológicas na disposição, no tamanho, densidade, nem na forma das células. Assim sendo, utilizamos uma única descrição morfológica para todos os grupos.



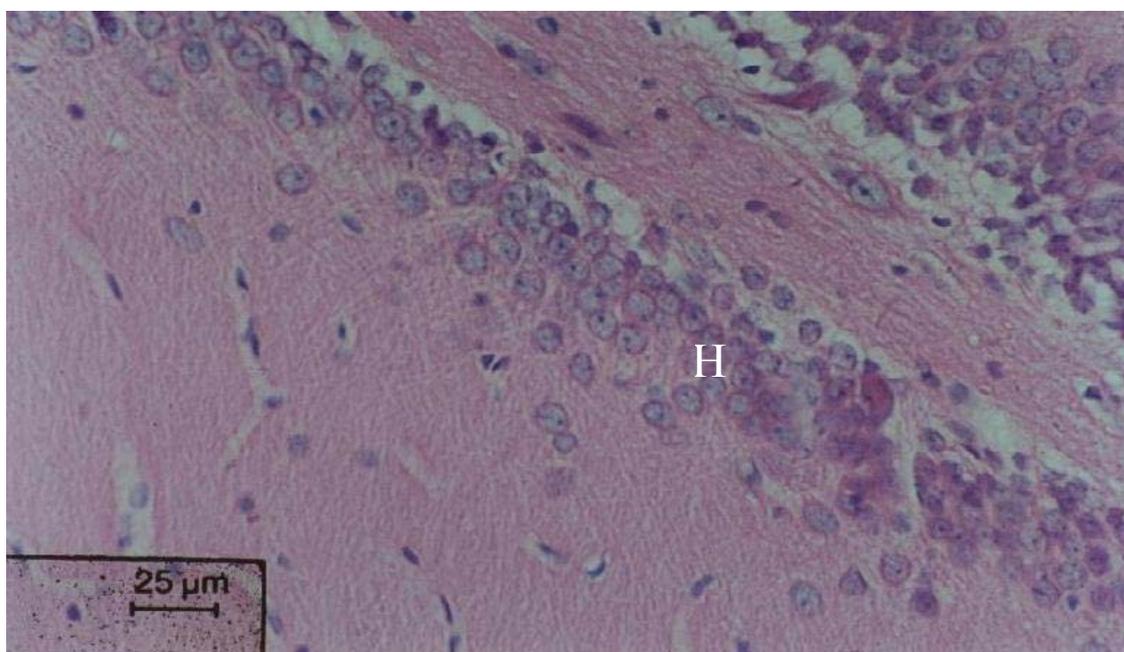
**FIGURA 9:** Fotomicrografia (Escala 100μm) do córtex cerebral de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg). Espessura normal da camada plexiforme (P) e da camada granular externa, a disposição e o tamanho das células se apresentam com características estruturais normais.



**FIGURA 10:** Fotomicrografia (Escala 50μm) do córtex cerebral de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg). Células nervosas granulares (G) com características estruturais normais - coloração HE.



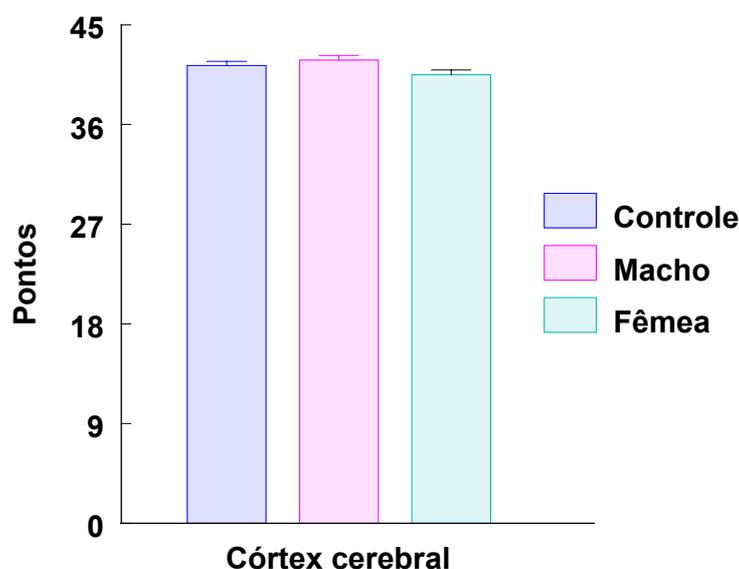
**FIGURA 11:** Fotomicrografia (Escala 50µm) do córtex cerebral de ratos submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg). Células nervosas piramidais (P), morfologicamente normais.



**FIGURA 12:** Fotomicrografia (Escala 25µm) do córtex cerebral de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg). Hipocampo (H) íntegro com uma concentração normal de neurônios granulares (Coloração HE).

#### 4.1.8.3.2 - DADOS MORFOMÉTRICOS:

A análise quantitativa das células do córtex cerebral de rato não mostrou diferenças significantes, entre os grupos controle ( $41,33 \pm 1,91$ ) e tratado (macho =  $41,83 \pm 2,01$  e fêmea =  $40,5 \pm 2,43$ ), conforme ilustrado na figura 13.



**FIGURA 13:** - Resultados da morfometria do córtex cerebral de ratos, utilizando um retículo de WEIBEL com 25 pontos. Foram analisados 400 pontos por animal, e contados os pontos que incidiram sobre os núcleos dos neurônios.

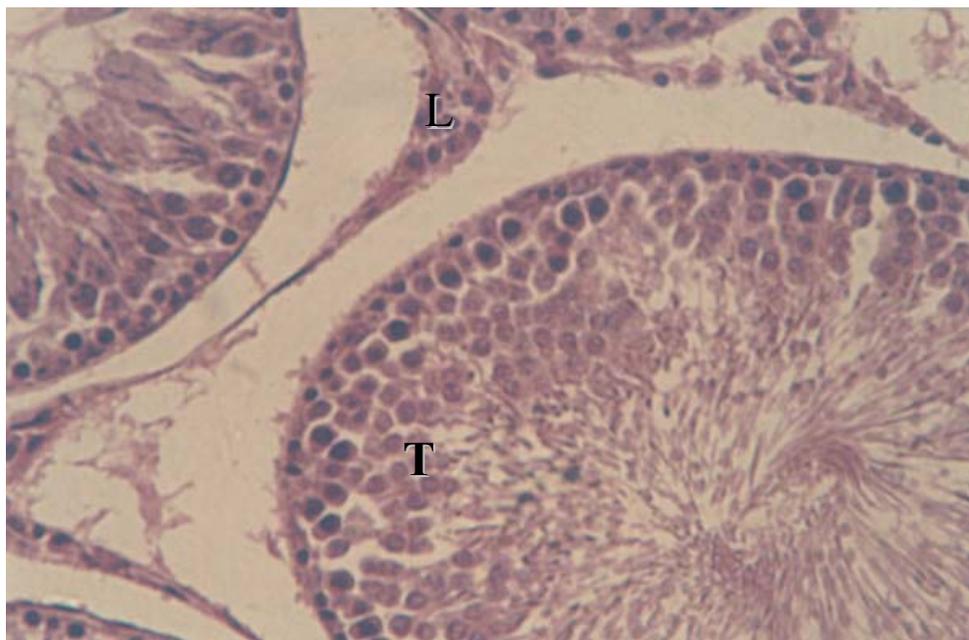
#### 4.1.8.4 - TESTÍCULOS E TÚBULOS SEMINÍFEROS:

##### 4.1.84.1 - DADOS MORFOLÓGICOS

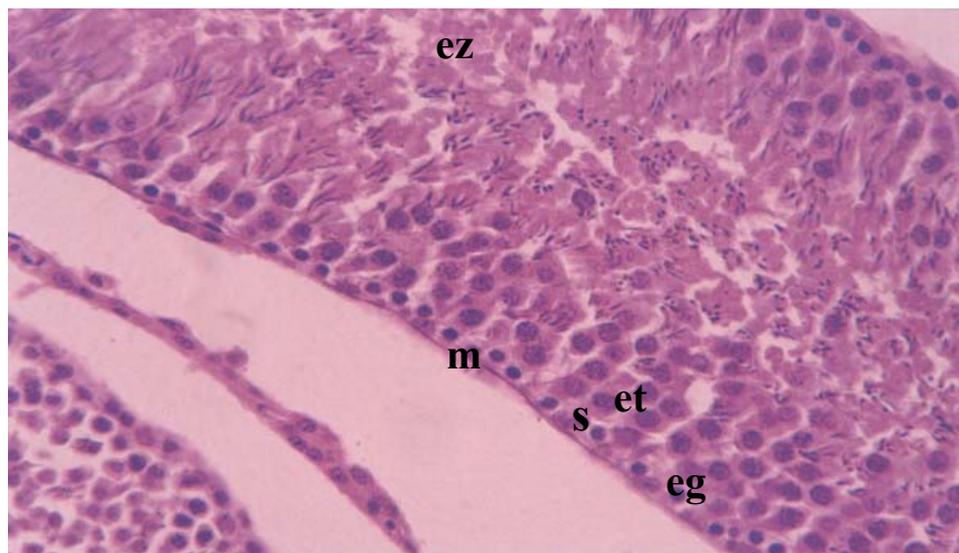
O testículo apresentou, no espaço intersticial, as células de Leydig de forma arredondada ou poligonal com núcleo central e citoplasma acidófilo, além de tecido conjuntivo com sua diversidade característica.



**FIGURA 14:** Fotomicrografia do testículo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o). **E:** espaço intersticial; **T:** Túbulos seminíferos (obj 10x., coloração HE).



**FIGURA 15:** - Fotomicrografia do testículo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o). L: células de Leydig; T: túbulos seminíferos (obj 40x).



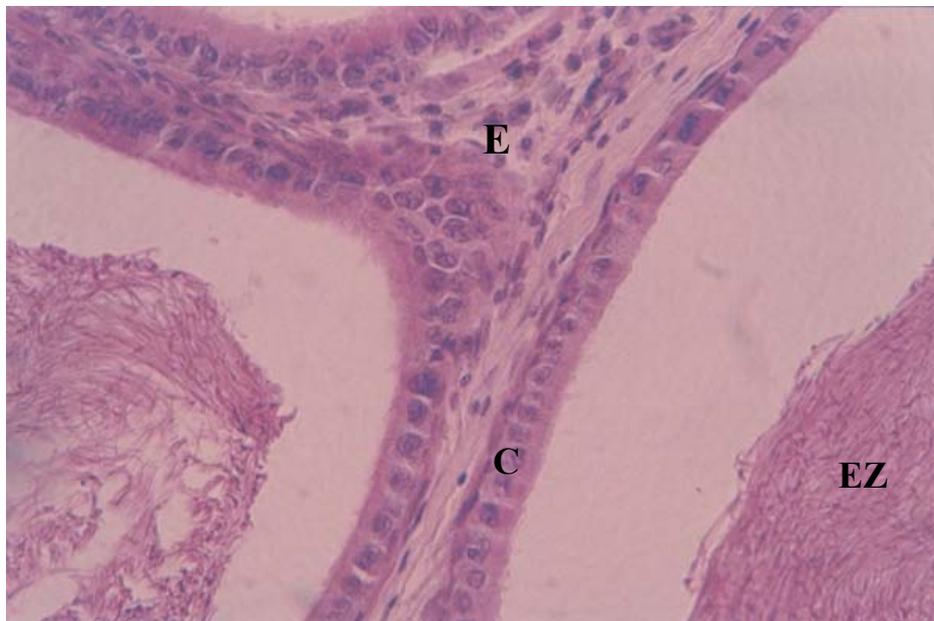
**FIGURA 16:** Fotomicrografia do túbulo seminífero de rato submetidos a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o). m : membrana basal; eg: espermatogônia; et – espermatócito; ez – espermatozóide; s – células de Sertoli (obj 40x, Coloração H.E).

Os túbulos seminíferos encontraram-se revestidos pela membrana basal (Figura 14). No interior desses túbulos visualizaram-se as células da linhagem germinativa masculina em diferentes estágios de desenvolvimento (Figuras 15 e 16), indo desde espermatogônias até espermatozóides, bem como as células de Sertoli, claras, com o núcleo triangular e citoplasma característico.

O epidídimo mostrou-se revestido por um epitélio pseudo-estratificado composto por células cilíndricas dotadas de estereocílios além de células basais (Figuras 17 e 18). Envolvendo o epidídimo observou-se uma espécie de cápsula constituída por tecido conjuntivo fibroso e, na luz desse órgão, evidenciam-se os espermatozóides. Não observamos diferenças na morfologia ente os grupos: tratado e controle.



**FIGURA 17:** Fotomicrografia de Epidídimo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg). E – epitélio; EZ – espermatozóide; C - cápsula (Obj. 10x).

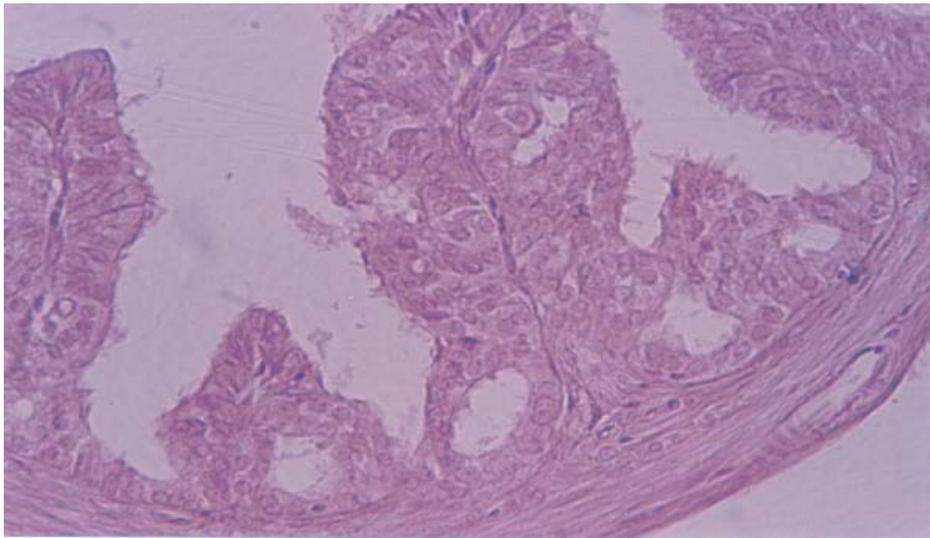


**FIGURA 18:** Fotomicrografia do epidídimo de rato submetido a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o). E – epitélio; EZ – espermatozóide; C - cápsula (Obj. 40x).

#### **4.1.8.5 - OVÁRIOS E TUBA UTERINA:**

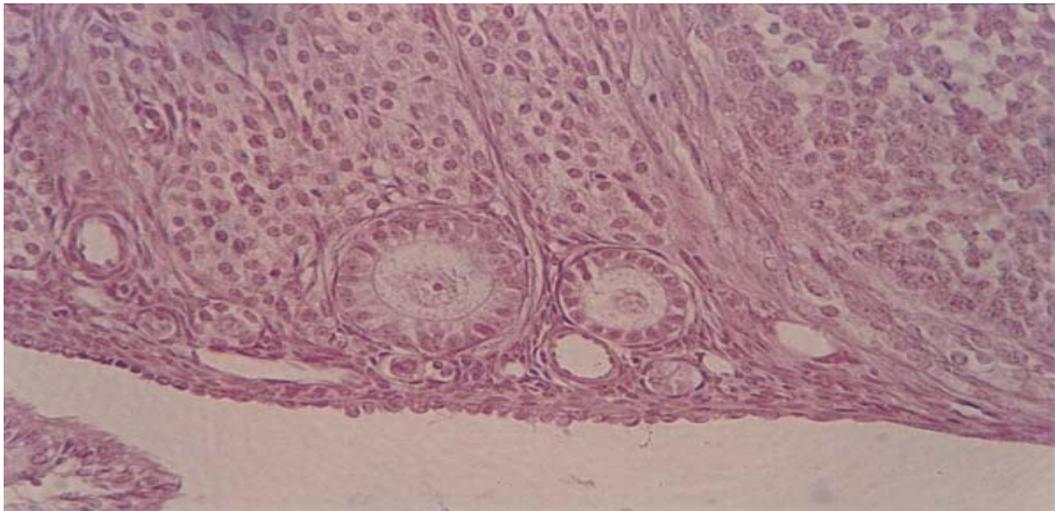
##### **4.1.8.5.1 - DADOS MORFOLÓGICOS**

Ovário apresentando região medular com numerosos vasos sangüíneos e regular quantidade de tecido conjuntivo frouxo morfologicamente normal (Figura 19).

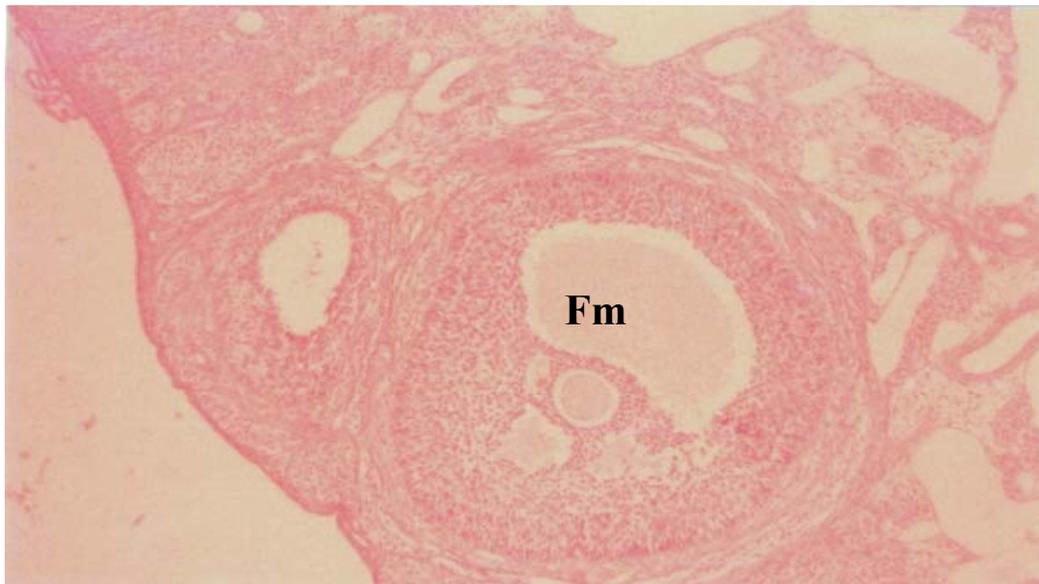


**FIGURA 19:** Fotomicrografia do ovário de rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg), (Obj. 10x).

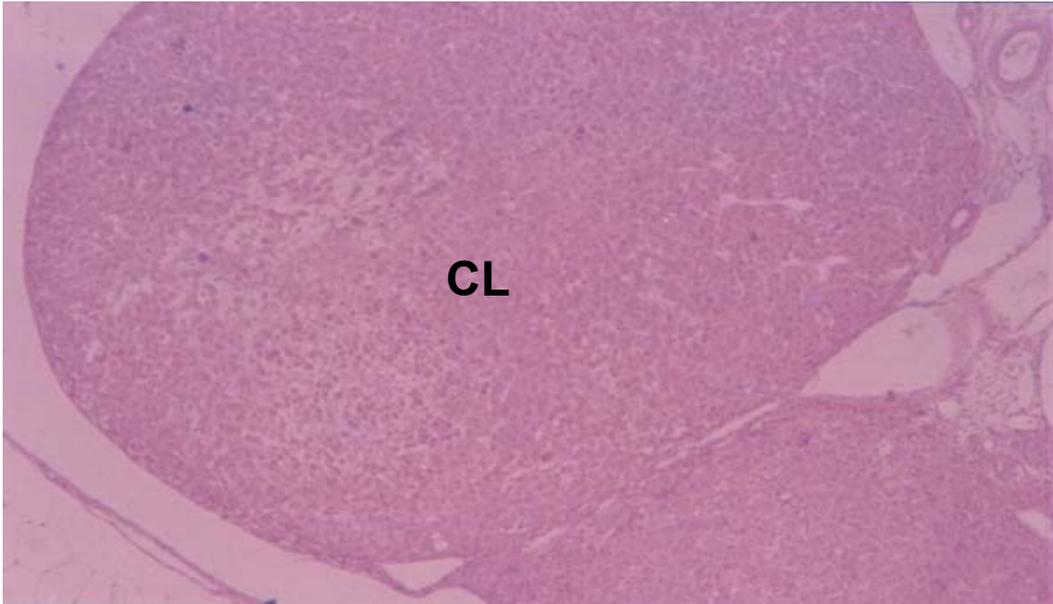
Na região cortical (Figuras 20 e 21), evidenciam-se folículos em diversos estágios de amadurecimento com estruturas normais.



**Figura 20:** Fotomicrografia da região cortical do ovário de rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg), (Obj. 10x).

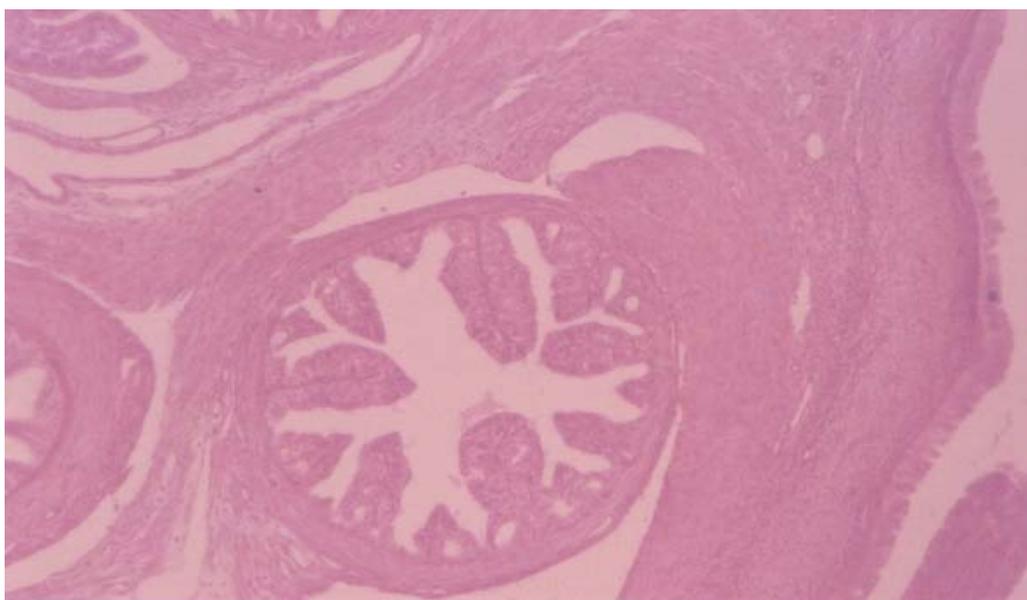


**FIGURA 21:** Fotomicrografia da região cortical do ovário da rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o). FM – Folículo maduro com aspecto morfológico normal (Obj. 40x).



**FIGURA 22:** Fotomicrografia dos corpos lúteos da rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1g/kg, v.o). Estruturas normais de (CL) corpos lúteos bem desenvolvidos (obj. 40x).

Observou-se a tuba uterina com suas estruturas características. A mucosa possui dobras longitudinais numerosas e longas. O revestimento epitelial da tuba uterina mostrou-se constituído por uma única camada de células cilíndricas ciliadas, apresentando algumas células secretoras também cilíndricas. A camada muscular é formada por fibras musculares lisas, separadas por tecido conjuntivo e revestida externamente pelo tecido conjuntivo da serosa. De maneira similar ao observado com testículo e túbulo seminífero, não observamos alterações na morfologia dos ovários e tuba uterina (Figuras 22 e 23).



**FIGURA 23:** Fotomicrografia da tuba uterina com suas estruturas características de rata submetida a tratamento prolongado por 30 dias com EB (1,0g/kg, v.o), (obj. 10x).

## V – DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o EB de *Mentha crispa*, único componente ativo do giamebil plus® é um fitoterápico seguro, possui baixa toxicidade por via oral e não interfere no processo de reprodução, em ratos.

A partir do estudo de observação geral, v. o., podemos supor que a maior mortalidade induzida pelo extrato para os camundongos em relação aos ratos, deva ser explicada, inicialmente por variáveis concernentes a espécie animal. Por outro lado, a diferença dos efeitos entre as duas diferentes vias de administração usadas, provavelmente se justifique pela presença de constituintes no extrato bruto (ex: óxido de piperitenona, linoleno, gama-moruleno, entre outros), os quais poderiam ter efeitos letais após ampla absorção, a partir da administração por via intraperitoneal, fato esse não observado pela via oral, ou pelo menos, que essa via não proporcione um padrão de absorção que leve à obtenção de concentrações plasmáticas suficientes para provocar letalidade.

Na estimativa da DL<sub>50</sub>, o padrão de resposta confirmou os resultados obtidos anteriormente na atividade geral, ou seja, por via oral não houve morte até 4,0g/kg em ratos e camundongos de ambos os sexos. Esses dados sugerem, a princípio, que o extrato apresenta baixíssima toxicidade por via oral, uma vez que, utilizamos uma dosagem cerca de 935 vezes maior que a dose empregada na terapêutica e, não observamos toxicidade. Já pela via intraperitoneal, a DL<sub>50</sub> de 24 horas em ratos machos foi cerca de 1,65 vezes maior que a obtida para as fêmeas. O motivo dessa diferença desconhecemos, entretanto alguns dados da literatura mostram que essas diferenças são relativamente comuns, como por exemplo os compostos, paration etílico, endrin, endossulfiran, apresentam em ratas DL<sub>50</sub> menores (LARINI, L., 1993) ou maiores que as obtidas para o macho, como no caso do clorprofam (TANAKA, T., *et al.*, 1997).

PARRA, A.L., *et al.* (1997), avaliando a toxicidade aguda por via oral do extrato fluido da *Mentha spicata* L. (precursora da *Mentha crispa*) observou que a DL<sub>50</sub> da mesma se encontrava acima de 2,0g/kg.

Apesar de não ter obtido o valor de DL<sub>50</sub> por via oral, tínhamos uma relativa segurança que o extrato apresentava baixa toxicidade, segundo a classificação de toxicidade adotada pela Comunidade Européia, (BARROS, S.B.M. & DAVINO, S.

C., 2003) partimos então para avaliar o efeito do tratamento prolongado sobre a fertilidade e performance reprodutiva, usando extrato, 0,5 e 1,0g/kg que ao final dos 30 dias de administração, representava uma dose cerca de 700 e 1400 vezes maior que a empregada na posologia do Giamebil plus®.

**TabelaXII:** Critérios utilizados pela comunidade Européia na Classificação de toxicidade.

<b>Categoria</b>	<b>DL<sub>50</sub> oral para ratos (mg/kg peso corpóreo)</b>
Muito tóxico	Menor que 25
Tóxico	De 25 a 200
Nocivo	De 200 a 2000

As razões pelas quais nos levaram a estudar a segurança da administração prolongada do EB sobre a fertilidade, desenvolvimento embrionário e performance reprodutiva se baseiam fundamentalmente: - na maior susceptibilidade da mulher à doenças infecciosas e a influência dessas sobre as fases da gravidez/lactação (BEDRAN, J.N., 1988). - Na mudança de hábito alimentar, que via de regra predomina uma dieta baseada em vegetais com a finalidade de reduzir ou compensar o excesso de calorias adquirida durante a gestação, mas que por outro lado, expõe a gestante a maior probabilidade de adquirir parasitoses, principalmente giardíase e finalmente a ausência de estudos com o extrato sobre essas fases, que por si representam um risco para a administração de qualquer droga, inclusive antiparasitárias que podem produzir alterações no embrião, feto ou lactente.

Nas Tabelas (I e II) pode-se constatar que a administração do extrato não modificou os índices de fertilidade do grupo tratado em relação ao grupo controle. Esses índices, no caso, refletem a capacidade de as fêmeas serem fecundadas. Já está bem estabelecido (GARLAND, T. & CARTIER, P.A., 1994) que uma das causas mais comuns da esterilidade feminina é a ausência de ovulação, que pode ocorrer devido à hipossecreção dos hormônios hipofisários ou por anormalidades ovarianas. Nossos resultados mostram que o extrato, possivelmente, não interferiu significativamente nos processos hormonais que levam à ovulação,

como também, provavelmente, não provocam alterações funcionais nos ovários. Esses dados são reforçados visto que a média de filhotes por mãe também não se encontrou significativamente alterado em relação ao grupo controle, indicando, com isso que, além de as fêmeas manterem a capacidade de serem fecundadas, apresentam também um número normal de filhotes que, segundo (HARKNESS, J.E., 1993), varia entre 6 e 12 filhotes (vide, Tabela XII, Apêndice).

O índice de gestação que indica a relação de fêmeas prenhas com fetos vivos reflete também a capacidade de as fêmeas fecundadas levarem a prenhez a termo, sem ocorrência de alterações fetais, que possam ser incompatíveis com a gestação e que levem à interrupção da prenhez. Esses resultados nos dão um indicativo de que o uso do extrato não produz alterações estruturais ou metabólicas durante a gestação em ambos, mãe e embrião, como fertilização de gametas anormais geneticamente, anomalias na fertilização, irregularidades na divisão do embrião que possam levar à inviabilidade no progresso da procriação ou a ocorrência de partos prematuros (BEDRAN, J.N., 1988).

O índice de viabilidade mostra o percentual de sobrevivência da prole até o quarto dia de nascimento, ou seja, indica alterações morfofuncionais (alterações estruturais ou metabólicas no feto), as quais seriam incompatíveis com a vida e levariam à morte prematura dos recém-nascidos. Nossos dados (Tabelas I e II) mostram que não houve diferença do grupo tratado em relação ao controle.

Algumas malformações induzem a morte nos primeiros dias de vida, outras não provocam a morte logo após o nascimento, mas por também comprometer o funcionamento do organismo, levam, depois de um período maior de tempo, ao óbito do recém-nascido. Estes tipos de malformações são observados pela avaliação do índice de lactação, onde expressa a percentagem de sobrevivência da prole no 21º dia em relação ao número de animais nascidos. Em nossos dados não foram observadas diferenças significativas neste índice entre os dois grupos.

O ambiente intra-uterino adverso leva geralmente ao retardo do crescimento fetal. As anomalias congênitas associadas ao tamanho fetal diminuído e ao nascimento se constituem em um grande grupo nos quais podemos citar basicamente: anomalias cromossômicas, erros inatos do metabolismo, baixa estatura primordial (RAMOS, J.L.A., 1986). Para avaliarmos se o extrato poderia induzir malformações que pudessem comprometer o desenvolvimento normal do

feto foram calculados as médias de peso no primeiro dia de vida do grupo tratado com os respectivos controles. Estas médias também não foram significativamente diferentes (tabelas I e II). Segundo HARKNESS, J.E. (1993), o peso de um rato no primeiro dia de vida se situa entre 5 e 6g. Cabe salientar que, em alguns dos nossos resultados, esses valores flutuaram um pouco acima dessa faixa, principalmente pela dificuldade em pesar imediatamente após o nascimento.

Como pode ser observado nas Tabelas I e II, o índice de fertilidade nem sempre foi igual a 100% em ambos os grupos, cerca de 85% nos grupo controle e cerca de 81% nos grupos tratados. Esse fato deve-se a possíveis alterações hormonais as quais impediam que as ratas fossem fertilizadas. Um possível efeito do extrato, a princípio sobre a capacidade de fertilização, parece improvável, uma vez que ambos os grupos não apresentaram resultados significativamente diferentes. Para descartar tal possibilidade, é necessário acompanhar o ciclo estral das ratas.

Em seguida, passamos a avaliar a influência da administração subcrônica do extrato sobre o desenvolvimento embrionário em ratas prenhas, em dois protocolos:

No primeiro protocolo, as ratas prenhas foram tratadas durante cada fase da gestação com EB, para observar o efeito deste em cada fase específica. No tratamento durante a primeira fase (pré-implantação), os resultados indicaram que o EB não exerce interferência nesta fase, na qual ocorrem as implantações dos óvulos fecundados.

No estágio de pré-implantação, que vai desde a fecundação até a implantação do blastocisto, dependendo do número de células atingidas, podemos observar ou não a embrioletalidade. É nesta fase que o embrião encontra-se com células totipotentes, em divisão, e, dependendo do número de células atingidas pelo agente teratogênico, elas são repostas por células normais ou não (NELSON, B.K., 1994). Baseados em nossos resultados podemos sugerir, observando a percentagem de reabsorção e implantação dos óvulos fecundados, que o extrato não exerce efeito tóxico nas células e não leva à embrioletalidade.

O estágio de organogênese é a fase mais susceptível à ação de agentes teratogênicos. Nesta fase podem ocorrer as malformações provocadas por esses agentes. O tipo de malformação depende da fase evolutiva do embrião e da

afinidade do composto pelo tecido embrionário, assim, nesta fase, foi avaliada a capacidade de o extrato induzir malformações fetais que fossem incompatíveis com a gestação. Podemos inferir que o extrato (Tabela IV) não apresenta efeitos tóxicos.

No período fetal, ocorre a diferenciação histológica e funcional dos diferentes órgãos e sistemas, além do crescimento ponderal do conceito. Os agentes administrados nesta fase podem provocar alterações funcionais que possam levar à morte dos recém nascidos, além de retardar seu desenvolvimento geral (FRITZ, H.& GIESE, K., 1990). O tratamento durante esta fase mostrou também não exercer efeitos tóxicos sobre o feto, visto que não ocorreram alterações nos aspectos macroscópicos gerais: polidactilia, evisceração fetal, exoftalmia, palatosquese, entre outros.

Nossos dados estão de acordo com os obtidos por SOUZA, I.A., *et al.*, (1998) que, utilizando EB de *Mentha crispa* 160 e 220mg/kg, v.o. durante as diferentes etapas da gestação, não verificou efeitos embriotóxicos nem teratogênicos.

No outro procedimento, os animais foram tratados durante todo o período de gestação (22 dias). Este tratamento englobou os três diferentes estágios da gestação a saber: pré-implantação, organogênese e crescimento.

Um dos mais importantes índices a serem observados neste tratamento é o índice de gestação que vai indicar as alterações nos diferentes estágios: esse índice (tabela III) não foi diferente nos grupos tratado e controle, o que nos dá um indicativo de que o extrato não atinge, pelo menos um número considerável de células, não provocando embriofetalidade. Em adição, não houve malformações nos embriões que pudessem levar à interrupção da gestação.

Possíveis alterações são avaliadas, observando-se o índice de viabilidade, que indicariam, neste caso, se ocorreram, em órgãos, alterações que fossem incompatíveis com a vida, ocorrendo o óbito do recém-nascido, logo após o parto. Outro índice que avalia possíveis alterações é o de lactação, que indica se ocorreram tais malformações após o tratamento, mas neste caso observando-se durante todo o período de gestação.

Os índices de viabilidade e lactação não foram significativamente diferentes na comparação entre os grupos tratado e controle, o que sugere que o extrato neste caso, não provoca malformações fetais durante toda a gestação e nem

interferem, a princípio, no processo de lactação (Tabelas III e IV). Esses resultados foram reforçados, observando-se a não existência de alterações nos aspectos macroscópicos gerais como polidactilia, evisceração fetal, exoftalmia, entre outras.

As médias das massas corporais dos filhotes no 1º e no 28º dia dos grupos tratado e controle, também não foram significativamente diferentes o que indica que o tratamento não leva ao nascimento de filhotes com baixo peso e não interfere no desenvolvimento da prole até a fase de desmame (21 dias).

Como um dado complementar, procuramos estudar a influência do tratamento com o EB sobre a performance reprodutiva dos ratos machos, realizando o mesmo protocolo que o utilizado para a avaliação da fertilidade em fêmeas.

Os grupos tratados não apresentaram diferenças significativas comparado aos respectivos grupos controle em relação aos índices de fertilidade (Tabelas V e VI), que reflete, no caso da avaliação da fertilidade do macho, a capacidade do macho fecundar. Com esses resultados, podemos sugerir, a princípio que o extrato não interfere na maturação e na viabilidade do espermatozóide.

Na observação do índice de gestação, podemos observar que não ocorreram diferenças significativas em relação ao grupo controle, o que nos dá um indicativo de que o extrato não induziu no espermatozóide alterações estruturais ou metabólicas que provocassem, secundariamente, no embrião durante a gestação alterações que culminassem em natimortos.

Ao analisarmos o índice de viabilidade e lactação, não observamos diferenças dos índices entre os grupos tratado e controle. O peso corporal da prole foi acompanhado até 7 dias após o desmame e as médias também não foram significativamente diferentes. Observamos também que não ocorreram alterações nos aspectos macroscópicos gerais.

A somatória dos nossos resultados apontam na direção de que o extrato de *Mentha crispera* não interfere na fertilidade, desenvolvimento embrionário e performance reprodutiva até a dosagem de 1g/kg. A princípio, não compartilha dos efeitos tóxicos reprodutivos produzidos pela *Mentha arvensis* (KANJANAPOTHI, D. et al., 1981, GARG, P. & JACOB, D. 1994, SHARMA, N. & JACOB, D. 1996, 2001, 2002).

Tendo em vista que os tecidos e as células variam grandemente em sua susceptibilidade a formas específicas de lesão química em relação ao agente supostamente agressor, passamos a avaliar a possível influência do tratamento prolongado com EB sobre o peso dos tecidos e sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e morfológicos.

Não foi observada nenhuma alteração macroscópica dos órgãos analisados nos grupos tratado e controle em ambos os sexos, após o tratamento. Posteriormente foram determinados os pesos úmidos dos órgãos e da mesma forma, não observamos diferenças estatisticamente significantes no peso úmido dos órgãos para os ratos de ambos os sexos, entre os grupos controle e tratado (Tabela VII). Como pode ser observado nessa mesma tabela o extrato não reduziu o peso do testículo como o foi para o extrato da *Mentha arvensis* (SHARMA, N. & JACOB, D. 1996, 2001, 2002<sup>a</sup>, 2002<sup>b</sup>).

Em relação aos perfis bioquímicos e hematológicos, a flutuação dos valores encontrados nos grupos controle e tratado se mantiveram dentro dos limites de referência (vide, Tabela XII, Apêndice).

Os níveis de glicose, os quais poderiam ser indicativos, caso existissem, de alterações hepáticas (hipoglicemia) e pancreáticas (hiperglicemia) e os níveis de creatinina que é um derivado do metabolismo protéico não se alteraram. Estes se encontram reduzidos nos casos de atrofia muscular e elevados em estados febris.

As atividades séricas das transaminases (ALT – AST) são de grande importância para o diagnóstico de distúrbios hepatobiliares, assim como os níveis de bilirrubina total, direta, e indireta (NOGUEIRA, D. M., 1990). Nossos resultados apontam que o extrato não apresenta efeito hepatotóxico. Os níveis normais de AST também são um indicativo da ausência de lesões no miocárdio e da presença de pericardite ativa.

Os níveis protéicos totais e suas frações, também permaneceram sem modificações significativas, esses resultados nos dão o indicativo de que não há presença de hepatopatia, que levaria a uma diminuição dos níveis de proteínas total por redução na produção, como também podemos descartar, a princípio, presença de doenças renais que levassem à perda protéica excessiva.

Na análise das frações lipídicas do sangue foram avaliados colesterol total e triglicerídeos. Variações fisiológicas da colesterolemia estão relacionadas com a dieta, idade e com o sexo. Alterações patológicas podem se dar devido à presença de alterações no pâncreas (icterícia obstrutiva), fígado (lesões hepáticas) e em alguns tipos de doenças renais. Variações na lipídemia (nível de triglicerídeos no soro) podem ocorrer fisiologicamente, após as refeições e, patologicamente na síndrome nefrótica, pancreatite e na cirrose hepática.

Para avaliação da função renal, foram determinados, na urina, os níveis de uréia, creatinina e ácido úrico, na amostra de 24 horas. Em nosso estudo, os níveis de uréia não foram significativamente alterados, o que nos dá um indicativo de ausência de doenças, como no caso da insuficiência renal e hepática, onde existe redução da excreção de uréia.

A determinação quantitativa da creatinina na urina é utilizada para se avaliar a função renal, pois quando relacionamos os níveis de creatinina no sangue com os níveis da urina, temos uma idéia da depuração renal deste metabólito protéico e, assim, podemos avaliar a função renal. Em nossos resultados, a excreção renal de creatinina não sofreu alterações significativa no grupo tratado em relação ao controle. SANTANA, C.F. *et al.* (1992) demonstraram que pacientes submetidos ao tratamento com extrato de *Mentha crispa* (cerca de 840mg), durante cinco dias, não apresentaram alteração dos parâmetros bioquímicos.

Quanto ao perfil hematológico, observamos que estes não se encontraram significativamente alterados em relação ao grupo controle. Esses parâmetros são úteis no diagnóstico de várias doenças. O número total de eritrócitos, por exemplo, pode ser alterado por variações fisiológicas, nas anemias, onde os níveis de hemoglobina (Hb) estão reduzidos e nas policitemias determinadas pela hipóxia, doenças cardíacas e pulmonares crônicas.

O hematócrito (Ht) é útil na determinação de alterações dos níveis de leucócitos, hemácias, plaquetas e plasma. Este parâmetro se altera em casos de desidratação, policitemias, anemias, descompensação cardíaca, entre outros.

O volume corpuscular médio (VCM) nos dá a informação da presença ou ausência de anemias e as classifica morfológicamente (normocítica, microcítica ou macrocítica). A concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) é

classificada no caso da presença de anemias, quanto ao conteúdo hemoglobínico (normocrômica ou hipocrômica). Os resultados do hemograma são um indicativo de que o EB não interfere na hematopoese nem na fisiologia normal dos eritrócitos, pois não observamos diferenças significativas nos índices eritrocitários do grupo controle em relação ao grupo tratado.

Os leucócitos podem sofrer variações numéricas causadas pelo uso de medicamentos ou substâncias tóxicas. As formas mais graves de leucopenia (diminuição do número total de leucócitos) apresentam quadros característicos na anemia aplástica, leucemias aleucêmicas e granulocitopenia (CARVALHO, W.F, 1983). Medicamentos e intoxicações também podem levar a leucocitoses, como no caso do uso da antipirina, pirogalol, digital, terebintina (YOUNG, G.A.R. & VINCENT, P.C., 1980). Não ocorreram diferenças significativas no número de leucócitos totais, nem no número das linhagens dos leucócitos, sendo isto um indicativo de que o EB não tem ação tóxica sobre a medula óssea.

Esses resultados estão de acordo com os de SANTANA, C.F., *et al.*, (1988), que após tratamento com extrato de *Mentha crispa* (100mg/kg, v.o.), durante 90 dias, em ratos, não se observaram alterações sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos. Posteriormente SANTANA, C.F. *et al.*, (1992) demonstraram, em seres humanos, que o tratamento por cinco dias com o extrato de *Mentha crispa* (cerca de 840mg), não produziu alterações também nos elementos figurados do sangue.

E, por fim, após o estudo dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, procedeu-se a análise microscópica de alguns órgãos com o objetivo de obter um estudo mais conclusivo acerca de supostas alterações anatomopatológicas que possam ser causadas pelo uso prolongado do extrato.

A administração subaguda do extrato em ratos de ambos os sexos não levou a alterações morfológicas e morfométricas no coração, rins e córtex cerebral. Não ocorreram também alterações nos órgãos reprodutivos de ratos machos (testículos e epidídimo) e fêmeas (ovários e tuba uterina). Esses resultados reforçam nossos estudos bioquímicos e hematológicos que demonstraram que o extrato não altera esses parâmetros, assim como, nos estudos de fertilidade, que demonstraram que o extrato não exerce efeitos tóxicos ao nível reprodutivo.

## **VI - CONCLUSÃO**

Em conclusão, nossos resultados indicam que o extrato bruto hidroalcoólico da *Mentha crispera*, espécie que é o único ingrediente ativo do fitoterápico Giamebil plus®, Apresentou baixa toxicidade, apenas por via oral até 4,0g/kg, Não interferiu nos processos relacionados com: fertilidade, desenvolvimento embrionário, performance reprodutiva e não alterou os parâmetros bioquímicos e hematológicos, assim como, a morfologia e morfometria dos tecidos até a dosagem de 1g/kg, administrado por 30 dias.

## VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, T, The return of thalidomide. *Sci. News* 146: 424-425, 1994.

AHVENAIEN, E.K., A study of cases of neonatal deaths. **J. *Pediatr.***, v.55, p. 691-705, 1959.

ALMEIDA, E.R., **Plantas medicinais Brasileiras – Conhecimento Popular e Científico**. 1ª Ed., São Paulo: Henus Editora Ltda, 1993.

ALMEIDA, E.R., MELO, A. M., XAVIER H., Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and Boldine in rats. **Phytother. Res**, v.14 (2), mar, p.99-102, 2000.

ANJANAPOTHI D., SIMITASIRI, PANTHONG, A., TAESOTIKUL T., RATTANAPANONE V. Postcoital antifertility effect of *Mentha arvensis*. **Contraception**, v.24 (5): p. 559-567, 1981.

ARMSTRONG, N. S. & ERNST, E., The treatment of eczema with chinese herbs: a sistematic review of randomized clinical trials. **Brit. J. clin. pharmacol.**, v. 48: p. 262-264, 1999.

ATTA, A.H., ALKOFABI A., Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plants extracts. **J. Ethnopharmacol.** V. 60: p. 117-124, 1998.

BAKER, J.H.; LINDSEY, J.R. & WEISBROTH, S.H. **The Laboratory Rat, Biology and Diseases**. Vol I. Academic Press. New York, 1979.

BARBOSA FILHO, J.M., HIRUMA, C.A., DA CUNHA, E.V.L., LIMA, E.O., BAHATTACHARYYA, J. ; O óleo essencial da *Mentha aff. Crispa* : Um estudo fitoquímico e microbiológico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 14, Caxambu, 1991, **Anais...** p.12.

BARBOSA FILHO J.M., BORBA M.O.P., ROUSSEL J.L., ANDARY C., Constituintes químicos do extrato de *Mentha crispera* HUDS. (LABIATAE)., In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12., 1992, Curitiba. **Anais...** p. 109.

BARROSO, S.M., Rumo à natureza. **Revista da Flora Medicinal**, In: CURSO DE FITOTERAPIA, 1998 **Apostila...** Recife: SINFAPE, 1998.

BARNES D.G., DOURSON, M., Reference dose (RfD); Description and use in health risk assessments. *Reg. Toxicol Pharmacol* v.8: p.471-486, 1988.

BARROS, S.B.M., DAVINO, S.C., Avaliação da toxicidade (In: Oga, S. **Fundamentos de Toxicologia**, 2ª Ed. São Paulo, Editora Atheneu, p. 58-76, 2003).

BECZNER, L.; HAMILTON, R.I.; ROCHON, D.M. Properties of *Mentha* strain of lychnis ringspot virus. **Intervirolology**, v.33 (1): p. 49-56, 1992.

BEDRAN, J.N., **O uso de drogas na gravidez e lactação**, Ed. Guanabara S.A., Rio de Janeiro, 1988.

BENESOVÁ, O. Drug treatment in Perinatal Period and Risk of Functional Teratogenicity. EUROTOX'95, **Toxicol. Lett. Sup.** 1/78 1-88, p. 3, 1995.

BERG, M.E. Van Den. **Plantas Mediciniais da Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém: Museu Paranaense "Emilio Goeldi". p.233. 1982.

BLASZCZYK, T., KRZYZANOWSKA, J., LAMER-ZARAWSKA, E. Screening for antimycotic proprieties of 56 traditional Chinese drugs. **Phytother. Res.** v.14 (3): p.210-212, 2000.

BLUMENTHAL, M., Herb industry sees mergers, acquisitions, and entry by pharmaceutical giants in 1998. **Herbal Gram**, v.45: p.67-68. 1999.

BORBA M.O.P., KOBAYASHI, S., ACA, I.S., BERINO, E., MEDEIROS, F.P. Frações ativas da *Mentha crispera* sobre a cultura de *Entamoeba histolytica* CEPA SAW 1627. Parte II In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11, JOÃO PESSOA, 1990, **Anais...** 4.69.

BORBA M.O.P., SILVA, J.F., MONTENEGRO, L., JUGMANN, P., CAVALCANTI, M. M., ALBUQUERQUE, P.M.S. Frações ativas da *Mentha crispera* sobre camundongos albinos *swiss* infectados com *Schistosoma mansoni* CEPA São Lourenço da Mata (SLM) Parte I. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11, JOÃO PESSOA, 1990, **Anais...** 4.90.

BRAGA, R., **Plantas do Nordeste – Especialmente do Ceará**. 4ª Ed. Natal: Editora Universitária da UFRN, 1983.

BRASIL, Secretaria da Vigilância Sanitária, **Norma para estudo de toxicidade e eficácia de Produtos Fitoterápicos**, Portaria n 116, 08 de agosto de 1996.

BRITO, N.R.S., **Quimiosistemática da Família Labiatae**. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro., Dissertação de Mestrado, 1983.

CALIXTO, J.B., Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines ( phytotherapeutic agents). **Brazilian J. Med. and Biol. Res.**, v.33: p.179-189, 2000.

CARNEIRO-LEÃO R.F.L., TOSCANO C.F., LEAL-CARDOSO J.H., LAHLOU S., Role of the autonomic nervous system in mediation of cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in rats. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE FARMACOLOGIA, 14, Águas de Lindóia, 2000, **Anais...** p.226, R. 10.168.

CARVALHO, W.F., **Técnicas médicas de hematologia e Imuno-hematologia**. 3ª. Edição, 1983, Ed. Cooperativa editora e de cultura médica Ltda. Belo Horizonte, Brasil

CASTRO J.A. toxicologia básica mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones. **Acta Bioq Clin Latinoamericana**, v.2: p.197-206, 1993.

CLARK, D.O., Pharmacokinetic studies in developmental toxicology: practical considerations and approaches. **Toxicol Methods**. v.3: p.223-251, 1993.

COELHO, M.G.P., MARQUES, P.R., GAYER, C.R.M., VAZ, L.C.A., NETO, J.F.N., SABINO, K.C.C., Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seed in mice with collagen-induced arthritis. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 77: p.159-165, 2001.

CORRÊA, M.P., PENHA L.A. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Rio de Janeiro ; **Instituto de Defesa Florestal**, Vol. 4, p. 168-177, 1975.

CRAVEIRO, A.A., ALENCAR, J.W., MATOS, F.J.A., MACHADO, M.I.L. MOMTE, F.J.Q. Novos óleos essenciais de Labiadas do Nordeste ( *Aeolanthus suavis e Mentha x villosa*). In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 13, Fortaleza, 1990, **Anais**. p.39.

CROWELL, P.L., Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. **Breast Cancer Res. Tr.** v.46 ( 2-3) p.191-197, 1997.

DE SMET P.A.G.M., The role of plant-derived drugs and herbal medicines in **healthcare. Drugs**, v.54: p.801-840, 1997.

DELLA-ROSA, H.V.; SIQUEIRA, M.E.P.B. & FERNICOLA, N.A.G.G. , **Monitorização Biológica da Exposição Humana e Agentes Químicos**, Fundacentro, S.Paulo, 1991 67p.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.82: p.337-90, 1944.

DREW, A. & MYERS, S.P., Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions. **Med. J. Australia**, v.166: p.538-541, 1997.

ELBETIEHA, A., AL-HAMOOD M.H., ALKOFABI, A. BATAINEH, Reproductive toxicology potentials of *Salvia fruticosa* ( Labiatae ) in rats. **J. Ethnopharmacology**, v.61: p.67-74, 1998.

ELBETIEHA, A., ORAN, S.A., ALKOFABI, A., DARMANI, H., RAIES. A. M., Fetotoxic potentials of *Globularia arabica* and *Globularia alypum* (*Globulariaceas*) in rats . **Journal of ethnopharmacology**, v.72, p.215-219, 2000.

FARRIS, E. & GRIFFITH, J.Q. **The rat in laboratory investigation**. Ed. Hafner Publishing Company. 2<sup>a</sup> ed. USA. 1971.

FAUSTMAN E.M., ALLEN B.C., KAVLOCK, R.J., KIMEL, C.A. : Dose-response assessment for developmental toxicity: I. Characterization of database and determination of no observed adverse effect levels. **Fundam. Appl. Toxicol.** V.23: 478-486, 1994.

FOWLER, J.S.L.N. & RUTTY, D.A., Methodological aspects of acute toxicity testing particularly LD50 determinations present use in development of new drugs. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v.52: p.20-30, 1983.

FRITZ, H. & GIESE, K., Evaluation of the teratogenic potential of chemicals in the rat. **Pharmacology**, v.40: p.1-28, 1990.

GALLINO, M., Chemical and botanical study of *Mentha denticulata* Strail (sensu Fiori) native to Piedmont. **Essenze deriv Agrum**, v.56 (4): p.337-344, 1986.

GANAPATHY, V., PRASAD, P.D., GANAPATHY, M.E., LEIBACH, H.F., Drugs of abuse and placental transport, **Adv. Drug Deliver Ver.**, v.1: p.99-110, 1999.

GARG, P., JACOB, D., *Mentha arvensis* leaf: an effective antinidational substance in laboratory mouse. **J. Adv. Zool.** v.15, p.32-36, 1994.

GARLAND, T., & CARTER, P.A., Evolutionary physiology. **Annu. Rev. Physiol.**, v.56: p.579, 1994.

GAYLOR, D.W., CHEN, J.J., Dose-response models for developmental malformations. **Teratology**, v.47: p.291-7, 1993.

GOONASEKERA M.M., GUNAWARDANA, V.K., JAYASENA K., MOHAMMED S.G., BALASUBRAMANIAM S. Pregnancy terminating effect of *Jatropha curcas* in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.47: p.117-123, 1995.

GRAVES, A.H. Breve resumo histórico do uso das plantas na Medicina. **Rev. Fl. Med.**, 12 (2): 43-65, 1945.

GRÜNWARD J., The European phytomedicines market : figures, trends, **Analisis. HerbalGram** , v.34: p.60-65, 1995.

GUEDES, D.N., SILVA, D.F., VERAS R.C., BARBOSA-FILHO, J.M., MEDEIROS, I.A. EDRF-NO is involved in the hypotensive effect of the essential oil of *Mentha x villosa* Hudson. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE FARMACOLOGIA 16, Águas de Lindóia, 2000, **Anais...** p.225, R. 10.164.

GUEDES, D.N., SILVA, D.F., BARBOSA-FILHO, J.M., MEDEIROS, I.A. Muscarinic Agonista Properties involved in the Hypotensive and Vasorelaxant Responses of Rotundifolone in Rats. **Planta Medica**, v.68: p.700-704, 2002.

HAAS, L.F., *Mentha piperita* (peppermint). **J. Neurosurg Psychiatry**, v.59: (6) p.607,1995.

HARKNESS, J.E., WAGNER, J.E., **Biologia e clínica de coelho e roedores**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo, Livraria Roca Ltda, 1993, Brasil.

HARLEY, R.M., Mints. In: Plants wild and cultivates (GREEN, P.S. ed.) KEW, **Royal Botanic Gardens**, p.126-128, 1973.

HIRUMA, C.A., ALMEIDA, R.N., BARBOSA FILHO, J.M., Óleo essencial de *Mentha x Villosa* Huds com atividade sobre o sistema Nervoso Central. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, Curitiba, 1992, **Anais...** p.073.

HIRUMA, C.A., **Estudo químico e farmacológico do óleo essencial das folhas da *Mentha x villosa* Hudson**. João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba., Dissertação de Mestrado, p.80,1993.

HIRUMA-LIMA, C.A., BARBOSA FILHO, J.H., ALMEIDA, R.N., Contribuição quimiotaxonômica para o gênero *Mentha*, In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13, Fortaleza, 1994, **Anais...** p.033.

JACKSON, D, **Index kewensis : Plantarum phanerogamarum**, vol. 2, Ed. Oxford University, ,1<sup>a</sup> Edição, 1946, Great Britain,.

KANJANAPOTHI, D., SMITASIRI, Y., PANTHONG, A., TAESOTIKUL, T., RATHNAPANONE, V., Postcoital antifertility effect of *Mentha arvensis*. **Contraception** 24: 559-567, 1981.

KELLER, K., Herbal medicinal products in Germany and Europe : experiences with national and European assessment. **Drug inf. J.**, v.30: p.933-948, 1996.

KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; LANARAS, T. Essential oils of spearmint (carvone-rich) plants from the island of Crete (Greece). **Biochem Syst Ecol**, v.23 (4): p.184-189, 1995.

LAHLOU S., CARNEIRO-LEÃO R.F.L., LEAL-CARDOSO J.H., TOSCANO C.F. Cardiovascular effects of the Essential Oil of *Mentha x villosa* and its Main Constituent, Piperitenone Oxide, in Normotensive Anaesthetised Rats: Role of Autonomic Nervous System. **Planta Medica**, 67 (7): 638-643, 2001.

LAHLOU S., MAGALHÃES, P.J.C., CARNEIRO-LEÃO R.F.L., LEAL-CARDOSO J.H., Involvement of Nitric Oxide in the Mediation of the Hypotensive Action of The Essential Oil of *Mentha x villosa* in Normotensive Conscious Rats. **Planta Med.**, v.68: p.694-699, 2002.

LARINI, L., **Toxicologia**. 2ª ed. São Paulo, Editora Manole Ltda, 1993, São Paulo, Brasil.

LIMA C.A.H., ALMEIDA, R.N., BARBOSA FILHO, J.M., THOMAS G., Efeitos farmacológicos do óleo essencial da *Mentha x Villosa* Hudson sobre o sistema Nervoso Central. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 9, Caxambú, 1994, **Anais...** 6.40.

LIMA, C.A.H., ALMEIDA, R.N., BARBOSA FILHO J.M., Avaliação do efeito antinociceptivo do óleo essencial e da Rotundifolona obtidos da *Mentha x villosa* HUDSON. Caxambú, In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 9, Caxambú, 1994, **Anais...** 6.16

LISON, L – **Histochemie et cytochemie animales**. Paris, Gauthiers – Villars, 842p. 1960.

LU, Y.F., Wang Q.J., Yang, S.L., The effect of *Mentha* oil on termination of pregnancy in mice. **Pai Chiu Em I Ko Ta Hsueh Pao**, v.15 (5) : p.155 – 158, 1989.

MALONE, R. A. Pharmacological approach to natural products screening and evaluation. In: **New natural products and plant drugs With Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**, ed. By H. Warner and P. Wolf. P. 24 – 53, Springer – Verlag, Berlin, 1977.

MATHUR R., Fructolysis effect of 50% ethanolic extract of *Mentha arvensis* Linn. (Leaves) in seminal vesicles of rat. **Acta. Eur. Fertil.** v.22 (4): p.219-20, 1991.

MATOS, F.J.A., **Farmácias Vivas**. Fortaleza, Ed. UFC, 1991. p.48-49.

MELLO, A.C.; SANTANA, C.F. & ALMEIDA, E.R. Primeiras observações sobre o uso da *Mentha crispa* e outros vegetais no tratamento das parasitoses intestinais, In: ENCONTRO ANUAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPE, I, RECIFE 1985, **Anais...** 1.36

MELO, A.M., PINHO, S., SANTANA, C.F., SANTOS, E.R., SOUZA, I.A., Primeiras observações sobre o uso da *Mentha crispa* em Tricomoniase urogenital., In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, Curitiba, 1992, **Anais...** p.160.

MENEGOLA, E., BROCCIA, M.L., PRATI, M., GIAVINI, E., Postcoital antifertility activity of aminoalcohols, **Reprod. Toxicol.**, v.12 (3): p.371-374, 1998.

MICHALANY, J., **Técnica em anatomia patológica**. E.P.U. 1980.

MILLER, L.C., TAINTER, M.L., Estimation of the ED<sub>50</sub> and error by means of logarithmic probit graph paper. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 57, 1944, p. 261-264.

MONTE, F.J.Q., FREITAS, M.R.F., LEMOS, T.L.G.L., Contribuição ao estudo químico de plantas medicinais In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11, João Pessoa, 1990, **Anais...** p.2,04.

NELSON, B.K., Interactions in developmental toxicology: A literature review and terminology proposal. **Teratology**, v.49: p.33-71, 1994

NOGUEIRA, D.M., STRUFALDI, M., HIRATA, M.H., ABDALLA, D.S.P., HIRATA, R.D.C., **Métodos de Bioquímica Clínica Técnica e interpretação**, Ed. Pancast, 1990, São Paulo, Brasil

OLIVEIRA, L.C., SOUSA, P.J.C., LEAL-CARDOSO, J.H., Óleo essencial de *Mentha x Villosa* e de óxido de piperitenona sobre a pressão arterial de ratos anestesiados. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 14, Caxambú, 1999, **Anais ...** P.200, R. 12.080.

PARRA, A. L., CAPÓ, J.T., GONZÁLEZ, Y.C., Toxicidad aguda oral del extracto fluido de *Mentha spicata* L. (*HIERBABUENA*). **Rev. Cubana Plant Med.** V.2(2-3): p.6-8, 1997.

PAUMGARTTEN, F.J.R., CARVALHO, R.R., MADI, K., CHAHOUD, I., Study of the effects of  $\beta$ -myrcene on rat fertility and general reproductive performance. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.31(7): p.955-965, 1998.

PETROVICK, P.R.; ORTEGA, G.G.; BASSANI, V.L. From a medical plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the brazilian medicinal plants. **Ciência e cultura**, 1997, 49 (5/6): 364-9.

PIANOWSKI, L.F., Desenvolvimento farmacêutico de um produto fitoterápico. Porto/Recife, Universidade do Porto, Portugal, p. 82, 2000, **tese de Doutorado**.

PICCAGLIA, R. Aromatic plants: a world of flavouring compounds. **Agro Food Industry hi-tech**, v.9(3): p.12-5, 1998.

RAMOS, J.L.A., LEONE, C.R., **O recém nascido de baixo peso**, Monografias Médicas, série "Pediatria" . Volume XXVII, São Paulo, Editora Sarvier, 1986, Brasil.

SANTANA ,C.F., SANTOS, E.R., Estudos toxicológicos do extrato etanólico da *Mentha crispera* em animais de experimentação. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 10, São Paulo, 1988, **Anais...** p. 17.

SANTANA, C.F., ALMEIDA, E.R., SANTOS, E.R., SOUZA, I.A., Action of *Mentha crispera* hidroethanolic extract in patients bearing intestinal protozoan. **Fitoterapia**, v.63:(5), p.409-10, 1992.

SCHWETZ B.A., MORRISSEY R.E., WELSCH, F., KAVLOCK, R.J., In vitro teratology. **Environ Health Perspect** v.94: p.265-268, 1991.

SHARMA, N., JACOB, D.,. Fertility supression of male mouse after administration of mint leaf extract. **Phytother. Res.** v.10, p.175-177, 1996

SHARMA N., JACOB, D. , Antispermatogetic effect of cromatographic fractions isolated from petroleum ether extract of *Mentha arvensis* leaf in the albino mouse. **Phytother. Res.**, v.11 (5),: p.386-388, 1997.

SHARMA N., JACOB, D. , Antifertility investigation and toxicological screening of the petroleum ether extract of leaves of *Mentha arvensis* L. in male albino mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.75, p.5 -12 , 2001.

SHARMA N., JACOB, D. Assessment of reversible contraceptive efficacy of methanol extract of *Mentha arvensis* L. leaves in male albino mice. **J. Ethnopharmacol.**, 80, p. 9 -13 , 2002.

SHU, Y.Z., Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, 61: 1053-1071, 1988.

SOUSA, P.J.C., MAGALHÃES P.J.C., LIMA, C.C., OLIVEIRA, V.S., LEAL-CARDOSO, J.H.. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of the guinea pig. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.30: p.787-791, 1997.

SOUZA, C.A.M.; CARVALHO R.R., KURIYAMA S.N., ARAUJO, L.B. RODRIGUES, R.P., VOLLMER R.S., ALVES E.N. PAUMGARTTEN, F.J.R. Study of the embriofeto-toxicity of *Crown-of-Thorns (Euphorbia mill)* latex, a natural molluscicide. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.30: p.1325-1332, 1997.

SOUZA, I.A.; SANTANA, C.F.; SANTOS, E.R.; MELO, A.M. & ALMEIDA, E.R. Primeiras observações do desenvolvimento embrionário em ratas prenhas submetidas ao tratamento com *Mentha crispera* (GIAMEBIL). **Revista do Instituto Oswaldo Gonçalves de Lima, Departamento de Antibióticos**, UFPE, Recife, PE, 1998.

TANAKA T., FUJITAMI, T., TAKAHASHI, O., OISHI, S., YONEYAMA, M., Developmental toxicity of chlorpropham in mice, **Reprod. Toxicol.**, v.11 (5): p.697-701, 1997.

TEIXEIRA, M.J., HOLANDA FILHA, J.G., SANTOS, F.A., FONSECA, S.G.C., RAO, V.S., SILVEIRA, E.R., MATOS, F.J.A., POMPEU, M.M.L., Avaliação do efeito Leishmanicida, *IN VITRO*, de óleos essenciais e princípios ativos de plantas medicinais brasileiras. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Águas de Lindóia, 1996, **Anais...** p.124.

VIJAYALAKSHMI, T., MUTHULAKSHMI, V., SACHDANANDAM P., Toxic studies on biochemical parameters carrier out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacol.**, v69: p.9-15, 2000.

VOIRIN, B., BAYET, C.; FAURE, O.; JULLIEN, F. Free flavonoid aglycones as markers of parentage in *Mentha aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata* and *M. x piperita*. **Phytochemistry**, v.50 (7), p.1189-93, 1999.

WANDERLEY, A.G., AFIATPOUR, P., NETO, P.R., SANTANA, D.P., Avaliação farmacológica do Extrato Bruto (EB) da *Mentha crispera* (*x villosa*). In: . REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 14, Caxambú, 1999. **Anais...**

WEIBEL, E.R., Stereological principles for morphometry in electron microscopy cytology, **Int. Rev. Cytol.** v.26: p.235-302, 1969.

WHO – **principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals.** Parte I EHC 6, 1978

YOUNG, G.A.R. & VINCENT, P.C., Drug-induced Agranulocytosis. **Clin. Haematol.** v.9: p.483, 1980.

## **VII – APÊNDICE**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Recife, 11 de setembro de 2003

Ofício nº 196/2003

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Ao Prof. Almir G. Wanderley  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE

Prezado Professor,

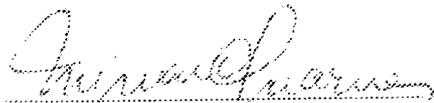
Após o recebimento de sua carta de encaminhamento solicitando análise do procedimento com animais no Projeto de pesquisa intitulado "Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato bruto da *Mentha crispata*", (processo 23076.001798/2003-80) os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) analisaram os aspectos relativos aos protocolos experimentais a serem adotados.

Concluímos que na versão atual, os procedimentos descritos para o manejo e cuidado dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

De acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos, ressaltamos ainda que o sacrifício dos animais experimentais, realizado no presente trabalho, justifica-se pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico.

Diante do exposto, emitimos um parecer favorável aos protocolos experimentais propostos.

Atenciosamente,

  
Profª. Miriam Cury Guimarães

  
Profª. Rejane Lara da S. Andrade da Costa

## Biologia e Manejo

**Tabela 2.6** – Os valores relacionados abaixo são aproximações e não necessariamente representam os níveis normais de uma determinada população. As fontes consultadas estão incluídas entre os textos citados no Capítulo 1 e as publicações específicas após as respectivas seções do Capítulo 2.

### Valores fisiológicos dos ratos

Peso adulto (macho)	450 a 520g
Peso adulto (fêmea)	250 a 300g
Peso ao nascer	5 a 6g
Área da superfície corpórea	10,5 (peso em gramas) <sup>2/3</sup>
Temperatura corpórea	35,9 a 37,5°C
Número de cromossomos em célula diplóide	42
Ciclo de vida	2,5 a 3,5 anos
Consumo de alimento	10g/100g/dia
Consumo de água	10 a 12ml/100g/dia
Transito gastrintestinal	12 a 24h
Início da vida reprodutiva (macho)	65 a 110 dias
Início da vida reprodutiva (fêmea)	65 a 110 dias
Duração do ciclo estral	4 a 5 dias
Tempo de gestação	21 a 23 dias
Cio pós-parto	Fértil
Tamanho da ninhada	6 a 12 filhotes
Idade de desmame	21 dias
Duração da vida útil reprodutiva	
Biotério	350 a 440 dias
Criações comerciais	7 a 10 ninhadas
Produtividade	4 a 5 filhotes/mês
Composição do leite	
Gorduras	13,0%
Proteínas	9,7%
Lactose	3,2%
Frequência respiratória	70 a 115 mov. resp./min
Volume inspirado	0,6 a 2,0ml
Consumo de oxigênio	0,68 a 1,10ml/g/h
Frequência cardíaca	250 a 450 bpm
Volume sangüíneo	54 a 70ml/kg
Pressão sangüínea	84 a 134/60mmHg
Eritrócitos	7 a 10 × 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>
Hematócrito	36 a 48%
Hemoglobina	11 a 18g/100ml
Leucócitos	6 a 17 × 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
Neutrófilos	9 a 34%
Linfócitos	65 a 85%
Eosinófilos	0 a 6%
Monócitos	0 a 5%
Basófilos	0 a 1,5%
Plaquetas	500 a 1300 × 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
Proteína sérica	5,6 a 7,6g/100ml
Albumina	3,8 a 4,8g/100ml
Globulinas	1,8 a 3,0g/100ml
Glicose sérica	50 a 135mg/100ml
Nitrogênio sangüíneo (uréia)	15 a 21mg/100ml
Creatinina	0,2 a 0,8mg/100ml
Bilirrubina total	0,20 a 0,55mg/100ml
Lipídeos séricos	70 a 415mg/100ml
Fosfolipídeos	36 a 130mg/100ml
Triglicérides	26 a 145mg/100ml
Colesterol	40 a 130mg/100ml
Cálcio sérico	5,3 a 13,0mg/100ml
Fosfato sérico	5,3 a 8,3mg/100ml