

JOSÉ DE CASTRO SOUZA NETO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ALTERAÇÃO REPRODUTIVA
DO EXTRATO BRUTO ALCALOÍDICO DE *Aspidosperma pyrifolium*
(Apocinacea) EM RATAS WISTAR PRENHE**

**RECIFE
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

JOSÉ DE CASTRO SOUZA NETO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ALTERAÇÃO REPRODUTIVA
DO EXTRATO BRUTO ALCALOÍDICO DE *Aspidosperma pyrifolium*
(Apocinacea) EM RATAS WISTAR PRENHE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

**RECIFE
2012**

*Aos meus pais, José de Castro Souza Filho e Maria
José Oliveira Silva de Castro, meus irmãos e
minha querida esposa Wanessa Alves.*

*À vocês, que sempre serão as pessoas mais
importantes da minha vida ...*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que em sua infinita sabedoria nos coloca diante de desafios e nos dá a capacidade de supera-los.

Ao Professor Doutor **Joaquim Evêncio Neto**, pela oportunidade de aprender, pela confiança, aconselhamento, orientação e amizade (meu orientador).

Ao Professor Doutor **Fabio de Souza Mendonça**, pelos ensinamentos, ajuda e amizade.

A Professora Doutora **Lígia Reis de Moura Estevão**, por toda contribuição, ensinamentos, atenção e amizade.

A Professora Doutora **Juliana Pinto de Medeiros**, pelo exemplo, ensinamentos e amizade.

Ao Professor Doutor **Haroudo Sátiro Xavier**, pelos ensinamentos e contribuição na execução deste trabalho.

A colega mestranda **Maria Edna Gomes de Barros**, por toda ajuda dispensada a execução deste trabalho.

Aos **colegas do grupo de pesquisa**, pelos momentos de estudo e descontração.

Ao funcionário **Tom Menezes** do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, pela atenção e esclarecimentos no transcorrer do curso.

Aos **funcionários do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal DMFA**, por toda atenção e serviços a nós prestados.

A **Universidade Federal de Pernambuco** através do **Departamento de Ciências Farmacêuticas** proporcionou condições necessárias à participação no programa.

Aos **animais** que com os seus corpos contribuem involutariamente para evolução da pesquisa.

Aos **doutorandos** Gibson Gomes de Oliveira e José Antônio de Sousa Pereira Júnior, por a amizade e as orientações no **Laboratório de Farmacognósia do DCFAR**.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- <i>Aspidosperma pyrifolium</i> (Fonte: RIET-CORREA et al., 2009)	14
Figura 2- Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal Universidade Federal Rural de Pernambuco (Fonte: Pessoal, 2012)	19
Figura 3- Casca de <i>Aspidospema</i> triturada (Fonte: Pessoal, 2012)	19
Figura 4- Casca de <i>Aspidospema</i> triturada adicionado Hexano (Fonte: Pessoal, 2012)...	20
Figura 5- Cromatografia (CCD) com reagente Dragendorff (Fonte: Pessoal, 2012).....	21
Figura 6- Cromatografia (CCD) na luz Ultra-violeta (Fonte: Pessoal, 2012).....	21
Figura 7- Funil de separação separando as fases aquosa e clorofórmica (Fonte: Pessoal, 2012)	21
Figura 8 - Bateria de coloração e microscópio óptico (Fonte: Pessoal, 2012)	22
Figura 9 - Gavagem, contenção e sonda (Fonte: Pessoal, 2012)	22

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1– Número de fetos em cada fêmea, por grupo, encontrado no 20º dia de experimento	24
Gráfico 2– Desenvolvimento ponderal ao longo do 20 dias de fêmeas tratadas e não tratadas com extrato bruto alcaloídico de <i>Apidosperma piryfolium</i> nos três grupos	25
Gráfico 3– Relação do ganho de peso das fêmeas durante o experimento	25

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ALTERAÇÃO REPRODUTIVA DO EXTRATO BRUTO ALCALOÍDICO DE *Aspidosperma pyriforme* (Apocinacea) EM RATAS WISTAR PRENHE

Resumo

A ingestão de plantas tóxicas representa uma importante causa de problemas relacionados ao estado sanitário de rebanhos bovino, caprino e ovino, afetando diferentes áreas da saúde animal, sendo uma delas a reprodução. Várias plantas são capazes, quando ingeridas, de causar dano à saúde dos ruminantes, afetando os mais diferentes órgãos ou sistemas, inclusive o reprodutivo. Este experimento teve o objetivo de avaliar a capacidade de alteração reprodutiva do extrato bruto alcaloídico de *Aspidosperma pyriforme* em ratas wistar prenhes. Para isto foram utilizadas 18 ratas prenhes divididas em três grupos experimentais de 06 animais, conforme tratamento recebido por via endoesofágica do primeiro ao vigésimo dia de prenhez, a saber: **Grupo I (EP)** - animais tratados com Extrato Placebo (01 ml de água/dia); **Grupo II (ECA1)** - animais tratados com Extrato Concentrado Alcaloídico de *Aspidosperma pyriforme* a 0,002 mg/ml; **Grupo III (ECA2)** - animais tratados com Extrato Concentrado Alcaloídico de *Aspidosperma pyriforme* a 0,004 mg/ml. Foi observado aumento significativo de peso nos animais do grupo (I) e aumento relativo nos animais do grupo (II), enquanto que os animais do grupo (III) não apresentaram alteração significativa de peso no período da prenhez. Aos 20 dias de gestação, quanto ao número de fetos, foram observados os seguintes resultados: Grupo I, média de 4,33 fetos/fêmea; Grupo II, média de 1,33 fetos/fêmea e Grupo III média de 0,00 fetos/fêmea (fêmeas sem fetos). Conclui-se que o extrato concentrado alcaloídico de *Aspidosperma pyriforme* altera a reprodução de ratas, quando administrado do 1º ao 20º dia de prenhez, provocando perda de peso nas fêmeas e diminuição no número de fetos (concentração de 0,002 mg/ml) e perda de peso e ausência de fetos (concentração de 0,004 mg/ml).

Palavras-chaves: Pau pereiro, alcaloídes, gestação, ratas

EVALUATION OF REPRODUCTIVE CAPACITY OF AMENDMENT OF CRUDE EXTRACT OF *Aspidosperma alkaloids pyrifolium* (Apocinacea) in Wistar rats pregnant

Abstract

The ingestion of toxic plants is an important cause of problems related to health status of herds cattle, goat and sheep, affecting different areas of animal health, one of the playback. Many plants are capable, when ingested to cause diseases in ruminants, affecting many different organs and systems, including the reproductive system. This experiment aimed to evaluate the ability to change reproductive crude extract alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium* in pregnant wistar rats. We used 18 pregnant rats were divided into three experimental groups of 06 animals each, according to treatment received by gavage from the first until the twentieth day of pregnancy, namely: **Group I (EP)** - treated animals with the placebo extract (01 ml of water / day); **Group II (ECA1)** – treated animals with concentrated extract alkaloids of *Aspidospema pirifolium* at a concentration of 0.002 mg / ml; **Group III (ACE2)** - treated animals with concentrated extract alkaloids of *Aspidospema pirifolium* at a concentration of 0.004 mg / ml. Significant increase in weight in the animals of group (I) and a relative increase in the animals of group (II), whereas the amines of the group (III) showed no significant change in weight during pregnancy. At 20 days of pregnancy on the number of fetuses, were observed the following results: Group I: average of 4.33 fetuses / female: Group II: average of 1.33 fetuses / female and Group III: average of 0.00 fetuses / female (females without fetuses). It is concluded that the concentrated extract alkaloids of *Aspidospema pirifolium* modifying reproduction of rats when administered from 1st to 20th day of pregnancy, causing weight loss in rats and decrease the number of fetuses (concentration 0.002 mg / ml) and weight loss and absence of fetuses (concentration 0.004 mg / ml).

Keywords: Pau pereiro, alkaloids, gestation, female rats

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Pereiro <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.....	12
2.2 Metabolismo Secundário das plantas.....	13
2.3 Aborto.....	14
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Animais de Experimentação.....	16
4.2 Material Botânico	17
4.3 Extrato Bruto Alcaloídico de <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.....	18
4.4. Experimento.....	20
4.4.1 Acasalamento e Confirmação da Prenhez	20
4.4.2 Administração Oral.	20
4.4.3 Laparotomia Exploratória	21
4.4.4 Avaliação Histologica	21
4.5. Análise Estatística.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6- CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIAS	25
8. ANEXOS	31

1. INTRODUÇÃO

Em um sistema de criação essencialmente extensivo, como o adotado na maioria das regiões do Brasil, a ingestão de plantas tóxicas representa uma importante causa de problemas relacionados ao estado sanitário dos rebanhos bovino, caprino e ovino, afetando diferentes áreas da saúde animal, sendo uma delas a reprodução. Várias plantas são capazes, quando ingeridas, de causar dano a saúde dos ruminantes, afetando os mais diferentes órgãos ou sistemas, inclusive o reprodutivo (CAMPOS & CARRER, 2010).

Podemos definir plantas tóxicas como todo o vegetal que introduzido no organismo de homens ou de animais, em condições naturais, é capaz de causar danos que se refletem na saúde e vitalidade desses seres. Elas ocasionam um desequilíbrio que se traduz no paciente como sintomas de intoxicação. São consideradas plantas tóxicas de interesse pecuário aquelas que, quando ingeridas espontaneamente, causam danos à saúde ou mesmo a morte dos animais. Estas plantas afetam sistemas ou órgãos específicos, causando, dependendo de cada planta, sinais clínicos e patológicos também específicos (TOKARNIA et al., 2000).

No Brasil, são descritas 88 espécies de plantas tóxicas, pertencentes a 50 gêneros. Apesar do grande número de espécies tóxicas, as identificadas como causadoras de perdas econômicas importantes na pecuária são relativamente poucas. Tokarnia et al., (2000) considera que as plantas que causam “morte súbita” são responsáveis por aproximadamente 60% de todas as perdas causadas por plantas tóxicas no país.

Muitos pesquisadores verificaram que a ocorrência, a frequência e a distribuição geográfica das intoxicações por plantas de interesse pecuário, em diferentes regiões são determinadas por fatores, como fome, sede, palatabilidade, período de ingestão, espécie animal, idade, deficiências minerais, estado e armazenamento da planta, transporte dos animais, superlotação, queimadas, fenação, exercício físico, vício, tolerância e imunidade dos animais (RIET-CORREA et al., 2007; TOKARNIA et al., 2000; BARBOSA et al., 2007).

A Caatinga do semi-árido nordestino ocupa uma área de 735 mil quilômetros quadrados, é composta de inúmeras famílias botânicas de ervas, arbustos, árvores e cipós, mas sendo dominada por vegetação tipo xerófila onde, segundo Fernandes (1996) é uma vegetação

que apresenta uma morfologia e um mecanismo fisiológico adaptativo para resistir em ambiente seco, cuja água disponível é proveniente exclusivamente do curto período de estação de chuvas.

O bioma caatinga é uma vegetação tipicamente brasileira, caracterizado por altas temperaturas, baixo índice pluviométrico e solos rasos. Contudo, sua vegetação é extremamente adaptada às condições climáticas e apresenta alto potencial forrageiro, constituindo a principal fonte alimentar para ovinos e caprinos no semiárido brasileiro. Não bastasse o potencial forrageiro, a flora da caatinga ainda é bastante utilizada na medicina caseira, como plantas típicas da região que possuem suas ações bem definidas no conhecimento popular, despertando assim o interesse de estudos que comprovem a eficácia de cada planta.

As toxinas presentes nas plantas podem influenciar diretamente na produção animal (CHEEKE, 1998). Na natureza há um grande número de espécies vegetais que apresentam princípios ativos capazes de promover distúrbios em animais (TOKARNIA, 2000). A caatinga apresenta inúmeras tipologias, que se manifestam como produtos da evolução, traduzidas em adaptações e mecanismos de resistência ou tolerância às adversidades climáticas (PEREIRA, 2007).

Várias plantas são citadas como potenciais causadoras de sérios danos à reprodução animal, ocasionando diversas patologias ou perdas econômicas significativas ao produtor, dentre elas a falta de desenvolvimento da glândula mamária e agalaxia, liberação prematura do corioalantóide (placenta prévia), placenta aumentada de peso, engrossada e fibrosa, gestação prolongada, parto distócico, dilatação e contrações diminuídas e aborto. Dentre estas plantas podemos destacar a *Aspidosperma pyrifolium*, *Ateleia glazioviana* e *Tetrapteryx spp.*, *Claviceps purpúrea* (RIET-CORREA, 2007).

Capaz de causar importante prejuízo ao agronegócio, à casuística de abortos em animais de produção envolvendo a ingestão de plantas tóxicas, em caprinos e ovinos, no semiárido do nordeste brasileiro e a utilização por populares como medicamento alternativo, tem preocupado profissionais de saúde e criadores, levando pesquisadores a estudar a vegetação local. A *Aspidosperma pyrifolium*, conhecida popularmente como “pereiro” tem sido identificada como sendo responsável por nascimentos prematuros. Segundo Medeiros et al.,

(2004), na Paraíba pesquisadores relataram abortos e perdas embrionárias em caprinos associados ao consumo desta planta.

Experimentalmente o aborto foi reproduzido em cabras, em diferentes fases de gestação, com a folha verde do pereiro recém colhida, na dose de 4g/kg, durante 19 dias de consumo. O consumo voluntário da planta, extrato aquoso do pereiro, a utilização de cabras amarradas em pereiro e pastejo em uma área onde havia uma predominância desta planta, também foram capazes de provocar aborto. Já as folhas dessecadas não foram capazes de provocar alterações reprodutivas em caprinos e ovinos (MEDEIROS et al., 2004).

Medeiros (2004), observou que os caprinos abortam quando ingerem pereiro em diferentes fases de gestação. Os abortos ocorrem principalmente durante o período seco, quando após um período sem chuvas não há mais forragem e o pereiro se mantém ainda verde, como a principal alternativa de alimentação, sendo os principais sinais clínicos o aborto ou o nascimento de cabritos prematuros que morrem após o parto. Parece que a planta, mais do que causar aborto induz o parto prematuramente, já que muitos animais nascem vivos e morrem após o parto. Se a gestação está a termo no momento de consumo da planta o cabrito consegue sobreviver. Se a planta for ingerida nos primeiros 34 dias de gestação causa mortalidade embrionária (MEDEIROS et al., 2004). Não há descrições de lesões fetais ou da placenta. Souza Lima et al. (2010), observou que ratas wistar prenhes tratadas com extrato de *A. pyrifolium* no dia 15 de gestação ou do 15º ao 17º dia gestacional apresentaram redução do peso fetal e fortes indícios de toxicidade materna.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pereiro *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

Aspidosperma pyrifolium Mart, é uma planta da família Apocynaceae, conhecida como pereiro, pau-pereiro, pereiro-vermelho, pau-de-coaru (CORREA, 1978). É uma planta que ocorre nos Estados do Nordeste até a Bahia e norte de Minas Gerais. Tem larga dispersão em toda a zona da caatinga, sendo geralmente encontrado na zona do sertão baixo do Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Paraíba, em vários tipos de solos e entre pedras e rochedos. É considerada espécie endêmica na caatinga (MAIA, 2004).



Figura 1 - *Aspidosperma pyrifolium* (Fonte: Pessoal, 2011).

O gênero *Aspidosperma* compreende tipicamente espécies arbóreas tropicais de grande porte (2 a 60 m de altura) (WOODSON, 1951; CORRÊA, 1978), com flores e sementes abundantes, copas amplas, folhas alternas espiraladas não agrupadas no ápice dos ramos, que podem apresentar látex abundante, sendo que, as mesmas não apresentam látex no tronco circular como a maioria das Apocynaceae. A floração vai de setembro a janeiro e frutificação de janeiro a março, figura 1 (BRAGA, 1976).

O pereiro possui várias utilizações, dentre elas a sua madeira é bastante utilizada para serviços de carpintaria, para fazer carvão, cerca e lenha (TIGRE, 1976).

2.2 Metabolismo Secundário das plantas

As plantas produzem uma grande variedade de compostos químicos, os quais são divididos em dois grupos, metabólitos primários e secundários. O metabolismo primário é considerado como uma série de processos envolvidos na manutenção fundamental da sobrevivência e do desenvolvimento, enquanto o metabolismo secundário consiste num sistema com importante função para a sobrevivência e competição no ambiente (DIXON, 2011).

Cerca de 20% das espécies de plantas conhecidas acumulam alcalóides, com maior frequência nas Dicotiledôneas (LUCA & LAFLAMME, 2001). Essas substâncias podem ser encontradas em diferentes partes do vegetal (SOTTOMAYOR et al., 2004), e em representantes de diversas famílias (LORENCE & NESSLER, 2004). Essa classe de substâncias do metabolismo secundário é famosa pela acentuada ação sobre o sistema nervoso central, sendo muitos deles utilizados como venenos ou alucinógenos (LUCA & PIERRE, 2000).

Neste contexto de plantas bioprodutoras de alcalóides, insere-se o gênero *Aspidosperma*, família Apocynaceae, o qual tem sido alvo de inúmeros trabalhos sobre a química de vários alcalóides indólicos. Gilbert (1966) estudou 33 espécies de *Aspidosperma* de ocorrência no Brasil, resultando no isolamento de mais de 100 alcalóides indólicos, o que levou a conclusão da predominância desta classe de alcalóides neste gênero. Especificamente foi observada a ocorrência de alcalóides indólicos com uma grande variedade estrutural, dos quais, muitos deles contendo esqueleto b-carbonílico simples, sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos (ALLEN & HOLMSTEDT, 1980).

Pereira et al. (2007) realizaram um vasto levantamento das estruturas dos alcalóides indólicos identificados em espécies do gênero *Aspidosperma*. Nesta revisão foi possível observar a diversidade estrutural de cerca de 247 alcalóides indólicos

É atribuído aos alcalóides indólicos de espécies do gênero *Aspidosperma*, uma larga aplicação terapêutica (BOURDY et al., 2004). Este fato tem despertado nos pesquisadores, a necessidade de uma investigação mais apurada de uma correlação entre as atividades terapêuticas, com a grande ocorrência de alcalóides indólicos presentes no gênero *Aspidosperma*.

Dentre as várias atividades biológicas dos alcalóides indólicos, podemos destacar a ergometrina obtida de *Secale cornutum* (Esporão de centeio) que apresenta propriedade de contração intensa nos músculos uterinos e é contra indicada para pacientes com disfunção cardíaca, hepática e renal, hipertensão e problemas vasculares, mas é muito útil na prevenção e tratamento de hemorragia pós-parto e pós-aborto devido à atonia uterina após a expulsão da placenta (SCHRIPSEMA et al., 2004).

2.3 Aborto

Os abortos podem ser espontâneos ou induzidos, infecciosos ou não-infecciosos (JAINUDEEN & HAFEZ, 2004). Além do aborto pode ocorrer mumificação ou maceração após a morte fetal. Na mumificação o processo pode ser infeccioso ou não (ACLAND, 1998), e caracteriza-se pela morte do feto, que não é abortado, ocorrendo em vez disso reabsorção dos fluidos placentários (JAINUDEEN & HAFEZ, 2004). A maceração pode ocorrer por vários fatores, seguido de uma invasão bacteriana uterina por via hematogênica, com uma posterior infecção piogênica (PACHECO, 1997).

Nem toda alteração uterina resulta em morte fetal. Assim, o feto pode nascer prematuramente ou ao término normal da gestação, sobrevivendo ou não. Alterações sistêmicas em uma fêmea gestante podem afetar a placenta e/ou o feto, como, por exemplo, anemia, hipertermia, toxemia e doença respiratória. Em cabras, fatores como idade avançada, dificuldade em concepção, condição social baixa na hierarquia do rebanho, gestações com número de fetos superior ou igual a três e histórico de aborto estão associados ao risco de perda fetal (NASCIMENTO & SANTOS, 2003).

A mortalidade perinatal é definida como a morte de fetos ou recém nascidos, que ocorre antes do parto, durante o parto, ou nos primeiros 28 dias de vida. Mortes antes do nascimento são chamadas de aborto e as que ocorrem após o parto são consideradas neonatais. As principais causas de mortalidade perinatal em bovinos são os abortos, as mortes por distocia e as infecções neonatais. Ao contrário do que ocorre em ovinos e caprinos as mortes pelo complexo inanição/hipotermia/hipoglicemia/exposição não ocorrem ou são raramente diagnosticadas, assim como a predação, que é muito menos frequente do que em pequenos ruminantes (RIET-CORREA et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a capacidade de alteração reprodutiva do extrato bruto alcaloídico de *Aspidosperma pyrifolium* em ratas wistar prenhes.

3.2 Objetivos Específicos:

Avaliar as alterações clínica-reprodutivas em ratas prenhes tratadas com extrato bruto alcaloídico de *Aspidosperma pyrifolium* durante a gestação.

Avaliar os aspectos morfológicos do útero e do fígado de ratas prenhes tratadas com extrato bruto alcaloídico de *Aspidosperma pyrifolium* durante a gestação.

Avaliar o ganho de peso de ratas prenhes tratadas com extrato bruto alcaloídico de *Aspidosperma pyrifolium* durante a gestação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais de Experimentação.

Este trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, através do protocolo n° 23082.001660/2012-92.

Foram utilizadas 18 ratas (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, com idade de 03 meses, pesando 300 ± 50 g, oriundos do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Após a detecção da prenhez, as ratas foram divididas em três grupos experimentais de 06 animais cada, conforme tratamento recebido por via endoesofágica do primeiro ao vigésimo dia de prenhez, a saber:

Grupo I (EP) - animais tratados com Extrato Placebo (01 ml de água/dia) do 1° ao 20° dia de gestação;

Grupo II (ECA1) - animais tratados com Extrato Concentrado Alcaloídico de *Aspidospema pirifolium* a 0,002 mg/ml do 1° ao 20° dia de gestação;

Grupo III (ECA2) - animais tratados com Extrato Concentrado Alcaloídico de *Aspidospema pirifolium* a 0,004 mg/ml do 1° ao 20° dia de gestação.

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com tampas metálicas, medindo 40x50x20 cm, mantidas em salas com temperatura ambiente (22 ± 2 °C) controlada por meio de aparelho de ar condicionado e sistema de exaustão com renovação de ar quinze vezes por hora, com luminosidade de 60 lux, mantidos em ciclo claro escuro de 12/12 horas controlado por sensor de tempo, cama de maravalha, alimentados com ração comercial Presence da Purina do Brasil e água *ad libitum* (Figura 2).



Figura 2 – Biotério Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Fonte: Pessoal, 2012).

4.2 Material Botânico

A casca do caule *Aspidosperma pyrifolium* Mart. utilizada nesta pesquisa foi coletada no , município de Águas Belas, estado de Pernambuco, semi-árido do nordeste brasileiro, e catalogado no Herbário Geraldo Mariz do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco com identificação botânica 39331. Após trituração (Figura 3), a casca usada no experimento foi encaminhada ao Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE para preparação do extrato bruto alcaloídico.



Figura 3 – Casca de *Aspidospema* triturada (Fonte: Pessoal, 2012).

4.3 Extrato Bruto Alcaloídico de *Aspidosperma pyriforme* Mart.

A casca da árvore após seca, triturada e peneirada é obtido um pó com massa 708,30 g, colocado em um erlemayer de 1000 ml e adicionado Hexano. O solvente permaneceu por três dias, e depois de filtrado, foi concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, até eliminação do solvente. O cálculo do rendimento foi realizado através da relação da massa do extrato obtido com a massa de material vegetal seco utilizada na maceração.



Figura 4 – Casca de *Aspidosperma* triturada adicionado Hexano (Fonte: Pessoal, 2012).

Prospecção para alcalóides- Foram adicionados 2 mL de HCl 10% em 2 mL da solução etanólica do extrato bruto. Em seguida, a solução foi submetida ao aquecimento em banho-maria numa temperatura de 40 °C. Após o aquecimento a solução foi distribuída em quatro tubos de ensaio. Posteriormente, adicionou-se a cada tubo um revelador diferente, na seguinte ordem: Dragendorff, Mayer, Wagner e Hager. A leve turbidez ou a formação de precipitado roxo a laranja, branco a creme, marrom e marrom respectivamente indicaram a presença de alcalóides.

Cromatografia em camada delgada (CCD) – Foram aplicadas alíquotas de cada amostra em uma placa de sílica gel. Depois de seca, foi borrifado o reagente Dragendorff sobre a placa. O surgimento de coloração laranja na placa é indicativo da presença de alcalóides.

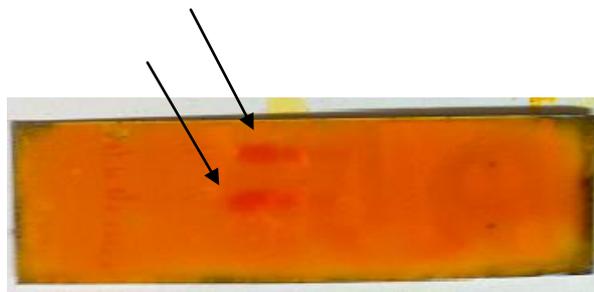


Figura 5 – Cromatografia (CCD) com reagente Dragendorff (Fonte: Pessoal, 2012).

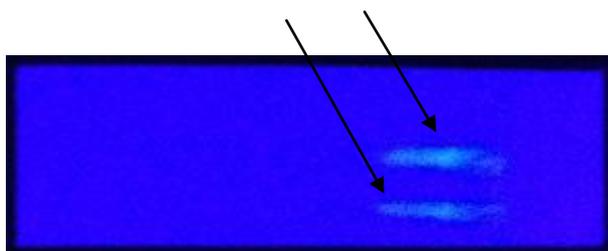


Figura 6 – Cromatografia (CCD) na luz ultra-violeta revelando a presença de alcalóides (Fonte: Pessoal, 2012).

Obtenção das frações alcaloídicas- Foi utilizada a metodologia descrita por Djilani et al. (2006), em que os extratos brutos foram submetidos à partição ácido-base. Os extratos brutos foram suspensos em água destilada, acidificados com HCl 10% para o pH 3-4, e em seguida, extraído com hexano a fim de remover substâncias lipofílicas e neutras. A fase aquosa ácida foi alcalinizada com NH₄OH (25%, m/m) para o pH 9-10, e em seguida, extraída com clorofórmio (figura 7)



Figura 7 – Funil de separação separando as fases aquosa e clorofórmica (Fonte: Pessoal, 2012).

4.4. Experimento

4.4.1 Acasalamento e Confirmação da Prenhez

Os animais foram colocados em sistema de harém, 1 macho para cada 3 fêmeas por um período diário de 12 horas (18:00h às 6:00h) até a constatação da prenhez. A fêmea que repetir o ciclo pela segunda vez sem apresentar prenhez foi descartada e substituída por outra.

A prenhez foi considerada quando constatado no esfregaço vaginal a presença de espermatozoides (considerado dia 1° de prenhez), verificada pela observação microscópica diária do esfregaço vaginal corado com coloração de Shorr Her (Figura 8).



Figura 8 – Bateria de coloração de Shorr e microscópio óptico (Fonte: Pessoal, 2012).

4.4.2 Administração Oral.

A administração do extrato placebo (grupo I) e do extrato concentrado alcaloídico de *Aspidosperm pyrifolliun* a 0,002 g/ml (grupo II) e 0,004 g/ml (grupo III) foi por via oral (gavagem), do 1° ao 20° dia de gestação, utilizando uma sonda endoesofágica (Figura 9).

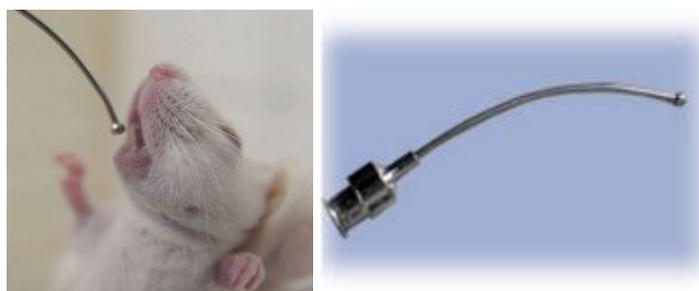


Figura 9 – Gavagem, contenção e sonda (Fonte: Pessoal, 2012).

4.4.3 Laparotomia Exploratória

No 20º dia de gestação os animais foram submetidos à anestesia dissociativa a base de cloridrato de xilasina a 2% associado a cloridrato de ketamina 10%, utilizando uma seringa de 1 ml para insulina com agulha 13 x 4,5. Para cada animal foi administrado por via intramuscular à dose de 0,25 ml / Kg da associação anestésica. Os fármacos foram colocados na mesma seringa, após 30 minutos procedeu-se à laparotomia exploratória, incisão com uma lâmina de bisturi nº 22 na linha média abdominal. Para a ortotonasia foi feito o aprofundamento do plano anestésico, utilizando anestesia inalatória a base de isoflurano. Em seguida foram coletados fragmentos de útero, ovário e fígado para análise histológica.

4.4.4 Análise Histológica

Os fragmentos dos órgãos coletados foram fixados em formol neutro tamponado a 10% por 24 horas, em seguida foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados pela parafina líquida em estufa e incluídos em parafina. Seguindo, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo *Minot*, ajustado para 05 micrômetros (μm) e previamente untado com albumina de Mayo, colocados em lâminas de vidro. Em seqüência, os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela hematoxilina-eosina (H.E) e analisados em microscópio de luz.

4.4.5. Análise Estatística

O teste “t” de Student foi utilizado para avaliar o ganho de massa e número de fetos, os dados foram tabulados e configurados em gráficos através no Programa GraphPad Prism version 5.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho observou que nas fêmeas tratadas com extrato bruto alcaloídico de *Aspidosperma pyrifolium* à concentração de 0,004 mg/ml houve inibição do vestígio gestacional no vigésimo dia de prenhez. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Cheeke (1998) que afirma que as toxinas presentes nas plantas podem influenciar diretamente na reprodução animal.

Quanto ao número de fetos por fêmeas no 20° dia pós intoxicação, os resultados expressos no gráfico 01, mostra que no Grupo I (EP), a média foi de 4,33 fetos/fêmea, no Grupo II (ECA 1) foi de 1,33 fetos/fêmea e no Grupo III (ECA 2) foi de 0,00 feto/fêmea (ausência de fetos). Estes resultados estão de acordo com os achados de Medeiros et al. (2004), quando observaram que o principal sinal clínico quando há intoxicação por *Aspidosperma* é o aborto.

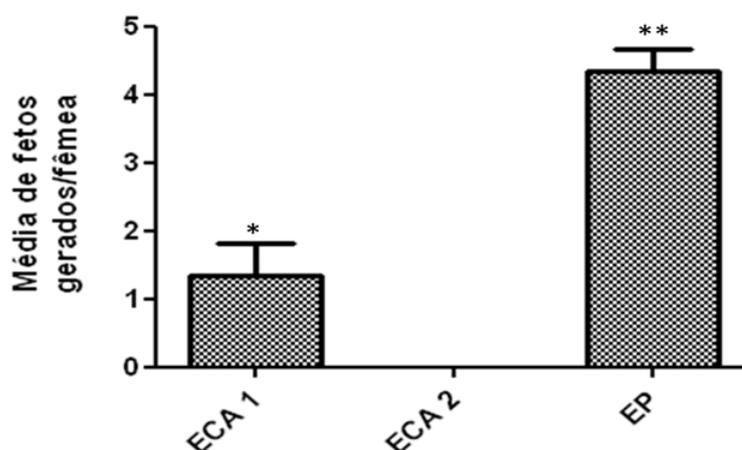


Gráfico 1 – Número de fetos em cada fêmea, por grupo, encontrado no 20° dia de experimento. (EP > ECA1 > ECA2)

Nossos achados também encontram respaldo nos resultados relatados por Souza Lima et al. (2010), quando relatam que ratas wistar prenhes tratadas com extrato de *A. pyrifolium* no 15° dia de gestação ou do 15° ao 17° dia gestacional apresentaram fortes indícios de toxicidade materna, caracterizada pela redução de peso das gestantes. Nos resultados (gráfico 2) também mostram diminuição de pesos das mães nos grupos GII e G III, quando comparados com o GI (GI > GII > GIII).

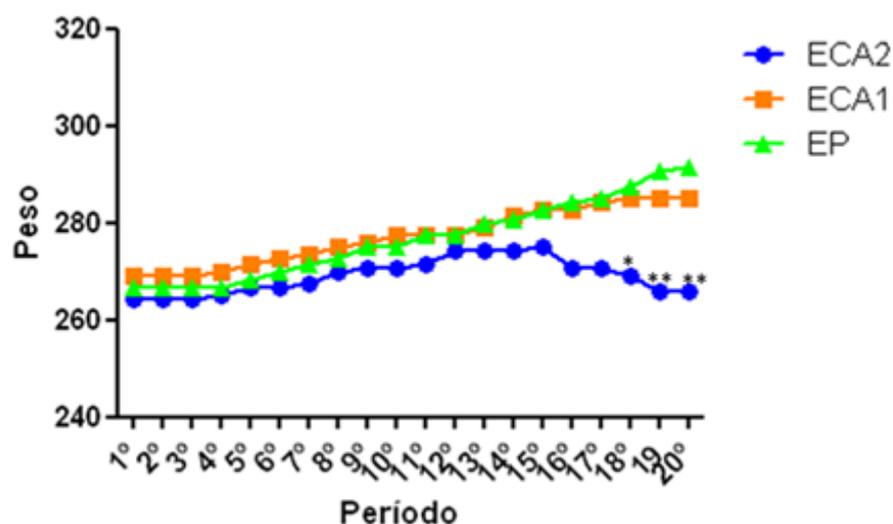


Gráfico 2 – Desenvolvimento ponderal ao longo do 20 dias de fêmeas tratadas e não tratadas com extrato bruto alcaloídico de *Apidosperma piryfolium* nos três grupos.

Os resultados expressos no gráfico 2, mostram também que as fêmeas do GI tiveram ganho de peso crescente do 4º ao 20º dia de prenhez. Enquanto que as fêmeas dos GII e GIII tiveram ganho de peso entre o 4º e o 14º dia de gestação. Sendo que do 15º ao 20º dia de geatação as fêmeas do GII mantiveram o peso e as fêmeas do GIII perderam peso..

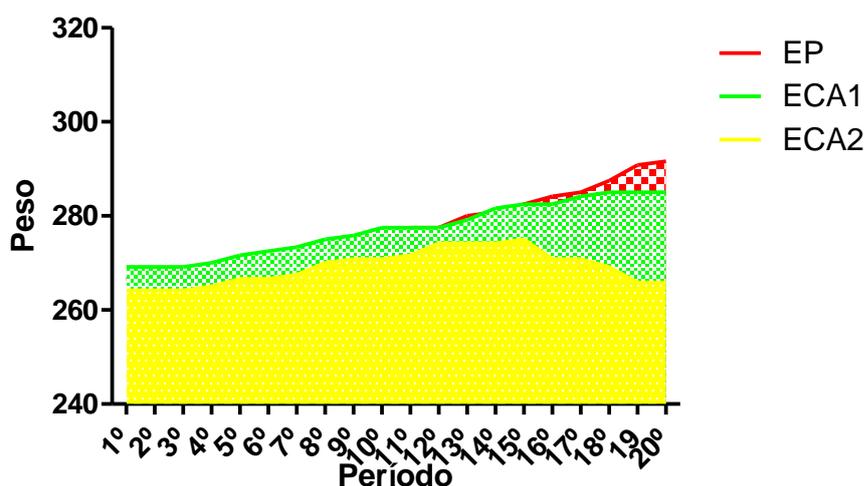


Gráfico 4 – Relação do ganho de peso das fêmeas durante o experimento.

Quanto aos resultados morfológicos não foram observadas alterações macroscópicas e nem microscópicas no fígado e no útero, quando comparados os três grupos experimentais.

6. CONCLUSÃO

Baseados em nossos resultados podemos concluir que, o Extrato Concentrado Alcaloídico de *Aspidospema pirifolium* altera a reprodução de ratas, quando administrado do 1° ao 20° dia de prenhez, provocando perda de peso nas fêmeas e diminuição no número de fetos (concentração de 0,002 mg/ml) e perda de peso e ausência de fetos (concentração de 0,004 mg/ml).

7. REFERÊNCIAS

ACLAND, H. M. Sistema reprodutor da fêmea. In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia Especial de Thomson**. 2º ed. Artemed. Porto Alegre, RS. p.541-572, 1998.

ALLEN, J.R.F.; HOLMSTEDT, B.R. The simple β -carboline alkaloids. **Phytochemistry**, v.19, n.8, p.1573-82, 1980.

BARBOSA, R.R.; FILHO, M.R.R.; SILVA, I.P.; SOTO-BLANCO, B. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e forma de estudo. **Acta Veterinaria Brasileira**. V.1, n.1, p. 1-17, 2007.

BOURDY, G.; OPORTO, P.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.269-77, 2004.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3.ed. Fortaleza: ESAM, 1976. 510p.

CAMPOS & CARRER. Produtos e serviços veterinários. **Plantas tóxicas**. Disponível em:<http://www.camposecarrer.com.br/default.asp?secao=det.asp&codigo=116&tipo=3>. Acesso em: 10 de janeiro de 2010.

CORREA. M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: IBDF, 1978. v.5, 687p.

CHEEKE, P.R. **Natural toxicants in feeds, Forages, and Poisonous Plants**. 2º ed. Danville: Interstate Publishers. 1998, 479p.

DIXON, R. A. **Natural products and plant disease resistance**. Nature, v. 411, p. 843–847, 2011.

DJILANI, A.; LEGSEIR, B.; SOULIMANI, R.; DICKO, A.; YOUNOS, C., 2006. New extraction technique for alkaloids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 17 (3): 518-520p.

FERNADES, A.G. **Conjuntos vegetacionais brasileiros**. Fortaleza: Editora UFC. 128p. 1996.

GILBERT, B. Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.38, supl., p.315-9, 1966.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Falha reprodutiva em fêmeas. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7ª ed. Ed. Manole. Barueri, SP. Cap. 17, p. 269-274, 2004.

LORENCE, A.; NESSLER, E. Molecules of interest. Camptothecin over four decades of surprising findings. **Phytochemistry**, v.65, p.2735-49, 2004.

LUCA, V.; LAFLAMME, P. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. **Physiology and Metabolism**, v.4, p.225-33, 2001.

LUCA, V.; PIERRE, B.S. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. **Trends in Plant Science**, v.5, p.168-73, 2000.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação, 2004, 413 p.

MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F.; BABOSA, I.M.; SILVA, Z.A.; BARBOSA, R.C.; MARQUES, A.V.M.S.; NOGUEIRA, F.R.B. Intoxicação por nitratos e nitritos em bovinos por ingestão *Echinochloa polistachya* (capim-mandante) e *Pennisetum purpurcum* (capim-elefante) no sertão da Paraíba. **Pesquisa veterinária Brasileira**, V.23. p.17-20. 2004.

MEDEIROS, R. M. T.; NETO, S. A. G.; RIET-CORREA, F.; SHILD, A. L.; SOUSA, N. L. Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por *Aspidosperma pyrifolium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, Suplemento, p. 42-43, 2004.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2ª ed. Ed. GUANABARA KOOGAN S.A. Rio de Janeiro, RJ, p. 74-79, 2003.

PACHECO, A. O. Maceración fetal espontânea em uma borrega: hallazgos ultrasónicos y cambios plamáticos em proteína específica de la preñez ovina by progesterona. **Version Biomedical**, v. 8, n. 1, p. 33-36, 1997.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v.30, n.4, p.970-83. 2007.

RIET-CORREA, G.; TERRA, F. F.; SHILD, A. L.; RIET-CORREA, F.; BARROS, S. S. Intoxicação experimental por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 91-96, 2005.

RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C. Plantas tóxicas e micotoxinas. In: RIET-CORREA, F.; SHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R. (Eds.). **Doenças de ruminantes e equinos**. 3.ed.Santa Maria: Palocci, 2007.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, V. 21, n. 1, p. 38-42, Jan./Mar. 2001.

SOUZA LIMA; M.C.; SOTO-BLANCO, B. **Intoxicação em caprinos por *Aspidospernia pyrifolium* Mart.**. Efeitos biológicos e citotóxica. **Toxicon**. p.4-320. 2010.

SOTTOMAYOR, M.; CARDOSO, I. L.; PEREIRA, L.G.; BARCELÓ, A. R. Peroxidases and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Phytochemistry Reviews**, v.3, p.159-71, 2004.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p.819-46.

TIGRE, C. B. **Estudos de silvicultura especializada do Nordeste**. Mossoró:ESAM, 1976 (reedição).

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Editora Helianthus, Rio de Janeiro, 320p., 2000.

WENINGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.193-200, 2001.

WOODSON, R.J. Studies in the Apocynaceae. VIII An Interim revision of the genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.38, p.119- 204, 1951.

ANEXOS

Tabela de relação de massas dos animais e dias do experimento do Grupo I

Dias	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)
1	CBÇ	275	Dorso A	255	Dorso B	260	C1	280	C2	270	C3	260
2	CBÇ	275	Dorso A	255	Dorso B	260	C1	280	C2	270	C3	260
3	CBÇ	275	Dorso A	255	Dorso B	260	C1	280	C2	270	C3	260
4	CBÇ	275	Dorso A	255	Dorso B	260	C1	280	C2	270	C3	260
5	CBÇ	280	Dorso A	255	Dorso B	265	C1	280	C2	270	C3	260
6	CBÇ	280	Dorso A	260	Dorso B	265	C1	280	C2	275	C3	260
7	CBÇ	280	Dorso A	260	Dorso B	265	C1	285	C2	275	C3	265
8	CBÇ	285	Dorso A	260	Dorso B	265	C1	285	C2	275	C3	265
9	CBÇ	285	Dorso A	265	Dorso B	270	C1	290	C2	275	C3	265
10	CBÇ	285	Dorso A	265	Dorso B	270	C1	290	C2	275	C3	265
11	CBÇ	290	Dorso A	265	Dorso B	270	C1	290	C2	280	C3	270
12	CBÇ	290	Dorso A	265	Dorso B	270	C1	290	C2	280	C3	270
13	CBÇ	290	Dorso A	270	Dorso B	275	C1	295	C2	280	C3	270
14	CBÇ	290	Dorso A	270	Dorso B	275	C1	295	C2	280	C3	275
15	CBÇ	295	Dorso A	270	Dorso B	275	C1	295	C2	285	C3	275
16	CBÇ	295	Dorso A	275	Dorso B	280	C1	295	C2	285	C3	275
17	CBÇ	295	Dorso A	275	Dorso B	280	C1	300	C2	285	C3	275
18	CBÇ	300	Dorso A	275	Dorso B	285	C1	300	C2	285	C3	280
19	CBÇ	305	Dorso A	280	Dorso B	285	C1	305	C2	290	C3	280
20	CBÇ	305	Dorso A	280	Dorso B	290	C1	305	C2	290	C3	280

Tabela de relação de massas dos animais e dias do experimento do Grupo II

Dias	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)
1	CBÇ	265	Dorso A	260	Dorso B	270	C1	275	C2	275	C3	270
2	CBÇ	265	Dorso A	260	Dorso B	270	C1	275	C2	275	C3	270
3	CBÇ	265	Dorso A	260	Dorso B	270	C1	275	C2	275	C3	270
4	CBÇ	265	Dorso A	265	Dorso B	270	C1	275	C2	275	C3	270
5	CBÇ	265	Dorso A	265	Dorso B	275	C1	275	C2	280	C3	270
6	CBÇ	270	Dorso A	265	Dorso B	275	C1	275	C2	280	C3	270
7	CBÇ	270	Dorso A	265	Dorso B	275	C1	280	C2	280	C3	270
8	CBÇ	270	Dorso A	270	Dorso B	275	C1	280	C2	280	C3	275
9	CBÇ	275	Dorso A	270	Dorso B	275	C1	280	C2	280	C3	275
10	CBÇ	275	Dorso A	270	Dorso B	280	C1	285	C2	280	C3	275
11	CBÇ	275	Dorso A	270	Dorso B	280	C1	285	C2	280	C3	275
12	CBÇ	275	Dorso A	270	Dorso B	280	C1	285	C2	280	C3	275
13	CBÇ	275	Dorso A	275	Dorso B	280	C1	285	C2	280	C3	280
14	CBÇ	280	Dorso A	275	Dorso B	285	C1	285	C2	285	C3	280
15	CBÇ	280	Dorso A	275	Dorso B	285	C1	290	C2	285	C3	280
16	CBÇ	280	Dorso A	275	Dorso B	285	C1	290	C2	285	C3	280
17	CBÇ	285	Dorso A	275	Dorso B	285	C1	290	C2	285	C3	285
18	CBÇ	285	Dorso A	285	Dorso B	280	C1	290	C2	285	C3	285
19	CBÇ	285	Dorso A	285	Dorso B	280	C1	290	C2	285	C3	285
20	CBÇ	285	Dorso A	285	Dorso B	280	C1	290	C2	285	C3	285

Tabela de relação de massas dos animais e dias do experimento do Grupo III

Dias	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)	Animal	Massa (g)
1	CBÇ	260	Dorso A	255	Dorso B	270	C1	265	C2	275	C3	260
2	CBÇ	260	Dorso A	255	Dorso B	270	C1	265	C2	275	C3	260
3	CBÇ	260	Dorso A	255	Dorso B	270	C1	265	C2	275	C3	260
4	CBÇ	260	Dorso A	260	Dorso B	270	C1	265	C2	275	C3	260
5	CBÇ	265	Dorso A	260	Dorso B	270	C1	270	C2	275	C3	260
6	CBÇ	265	Dorso A	260	Dorso B	270	C1	270	C2	275	C3	260
7	CBÇ	265	Dorso A	260	Dorso B	275	C1	270	C2	275	C3	260
8	CBÇ	265	Dorso A	265	Dorso B	275	C1	270	C2	280	C3	265
9	CBÇ	270	Dorso A	265	Dorso B	275	C1	270	C2	280	C3	265
10	CBÇ	270	Dorso A	265	Dorso B	275	C1	270	C2	280	C3	265
11	CBÇ	270	Dorso A	265	Dorso B	275	C1	270	C2	280	C3	270
12	CBÇ	270	Dorso A	270	Dorso B	280	C1	275	C2	280	C3	270
13	CBÇ	275	Dorso A	270	Dorso B	280	C1	275	C2	275	C3	270
14	CBÇ	275	Dorso A	270	Dorso B	285	C1	270	C2	275	C3	270
15	CBÇ	275	Dorso A	270	Dorso B	285	C1	270	C2	275	C3	275
16	CBÇ	270	Dorso A	265	Dorso B	280	C1	265	C2	270	C3	275
17	CBÇ	270	Dorso A	265	Dorso B	280	C1	265	C2	270	C3	275
18	CBÇ	270	Dorso A	265	Dorso B	280	C1	260	C2	270	C3	270
19	CBÇ	265	Dorso A	260	Dorso B	270	C1	260	C2	270	C3	270
20	CBÇ	265	Dorso A	260	Dorso B	270	C1	260	C2	270	C3	270

Relação do número de fetos por fêmea

Grupo ECA 1

Dia	Animal	Fetos	Animal	Fetos	Animal	Fetos	Animal	Fetos	Animal	Fetos	Animal	Fetos
20	CBÇ	2	Dorso A	1	Dorso B	0	C1	3	C2	2	C3	0

Grupo ECA 2

Dia	Animal	Fetos	Animal	Fetos	Animal	Fetos	Animal	Fetos	Animal	Fetos	Animal	Fetos
20	CBÇ	0	Dorso A	0	Dorso B	0	C1	0	C2	0	C3	0

Grupo EP

Dia	Animal	Feto	Animal	Feto	Animal	Feto	Animal	Feto	Animal	Feto	Animal	Feto
20	CBÇ	5	Dorso A	4	Dorso B	4	C1	5	C2	3	C3	5