

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Influência da exposição ao extrato etanólico obtido das flores de
Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. durante os períodos pré-gestacional,
gestacional e pós-parto, em ratos**

Marcela Dias Maciel

Dourados – MS
2018

MARCELA DIAS MACIEL

**Influência da exposição ao extrato etanólico obtido das flores de
Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. durante os períodos pré-gestacional,
gestacional e pós-parto, em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof.^aDr.^aArielle Cristina Arena

Co-orientador: Prof.^aDr.^aCandida Kassuya

Dourados - MS
2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO** APRESENTADA POR MARCELA DIAS MACIEL, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "**FARMACOLOGIA**", REALIZADA NO DIA 12 DE SETEMBRO DE 2018.

Ao décimo segundo dia do mês de setembro do ano de dois mil e dezoito (12/09/2018), às 08h, em sessão pública, realizou-se, na sala de videoconferência da Biblioteca do Hospital Universitário da Universidade Federal Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Influência da exposição ao extrato etanólico obtido das flores de *Achyrocline satureioides* (lam.) D.C. durante os períodos pré-gestacional, gestacional e pós-parto em ratos " apresentada pela mestrandia MARCELA DIAS MACIEL, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dra. Arielle Cristina Arena** (Presidente/orientador), **Dra. Aline Lima de Barros** (membro externo) e **Dra. Cibele dos Santos Borges** (membro externo). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 30 até 40 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido o candidato considerado **APROVADO**, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 12 de setembro de 2018.

Dra. Arielle Cristina Arena

Dra. Aline Lima de Barros

Dra. Cibele dos Santos Borges

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

EPIGRAFE

Consagre ao Senhor tudo o que você
faz, e os seus planos serão bem
sucedidos

(PROVÉRBIOS 16:3)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela vida, saúde e força de vontade concedida a mim para alcançar todos os meus objetivos. Sem a Tua presença constante em minha vida não conseguiria. Obrigada Senhor.

À toda a minha família pelo amor incondicional, e por me darem força e apoio sempre. Além da educação que me proporcionaram ao longo da minha vida.

À minha orientadora Dra. Arielle Cristina Arena, e à minha co-orientadora Dra. Candida Aparecida Kassuya, por todos os conhecimentos transmitidos, apoio e compreensão durante essa jornada.

Ao Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu pela parceria durante a toda a parte de experimentação animal. E aos alunos do laboratório de toxicologia por toda a ajuda na pesquisa em especial à Paola, Flávia, Leonardo, Bárbara, Mayra.

À minha banca examinadora, composta além da minha orientadora Dra. Arielle, por Dra. Aline de Lima Barros e Dra. Cibele dos Santos Borges por terem complementado essa pesquisa com todos os seus conhecimentos e terem permitido a finalização da mesma.

As professoras Dra. Maria do Carmo Vieira, Dra. Silvia Cristina Heredia Vieira e Dra. Cláudia Andrea Lima Cardoso, pela contribuição durante a coleta do material vegetal, preparo do extrato e análise fitoquímica do mesmo.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da UFGD por todo o apoio e incentivo durante todas as etapas do meu mestrado. Bem como, todos os professores que contribuíram com seus conhecimentos através das disciplinas cursadas e demais colaborações. Agradeço também aos colegas do mestrado que de alguma forma me auxiliaram durante o desenvolvimento desse trabalho.

Enfim, à todos que direta ou indiretamente contribuíram com essa pesquisa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Flores de <i>Achyrocline satureioides</i>	12
Figura 2 – Delineamento experimental	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
dL	decilitro
DL ₅₀	Dose Letal que corresponde à dose capaz de matar 50% dos animais em teste
DPN	Dia Pós-Natal
FDA	Food and Drug Administration
g	gramas
δ-GT	Gama-glutamilttransferase
kg	Kilogramas
L	Litros
mg	miligramas
mL	mililitro
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NOEL	No Observed Effect Level
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
T4	Tiroxina
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
U	Unidades
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
WHO	World Health Organization

RESUMO

A *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C., popularmente conhecida como “macela”, é uma espécie muito utilizada na medicina popular, sendo suas partes empregadas na forma de infusão e decocção com várias finalidades medicinais, tais como, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, entre outras. Entretanto, há poucos relatos na literatura de estudos de toxicidade dessa espécie vegetal. Assim, considerando seu potencial terapêutico versus a carência de estudos que avaliam sua toxicidade, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência da exposição ao extrato etanólico das flores de *A. satureioides* durante os períodos pré-gestacional, gestacional e pós-parto em ratos Wistar, através de avaliações de parâmetros reprodutivos e do desenvolvimento. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: três grupos receberam as doses de 250, 500 ou 750mg/kg do extrato, via oral (gavage), enquanto 1 grupo recebeu veículo (controle). O tratamento com o extrato etanólico de *A. satureioides* incluiu três períodos (pré-acasalamento, acasalamento e pós-acasalamento). Ratos machos adultos foram tratados durante 28 dias (2 semanas antes do acasalamento, durante o acasalamento e, 2 semanas após o acasalamento, enquanto as fêmeas adultas foram tratadas 2 semanas antes do acasalamento, durante o período gestacional e durante 13 dias de lactação). Após o término do tratamento, os animais foram eutanasiados e parâmetros reprodutivos e do desenvolvimento foram avaliados. Após análise fitoquímica, substâncias como quercetina, luteolina, entre outras, foram identificadas no extrato. Todos os parâmetros analisados nas fêmeas não foram afetados pelo tratamento. No entanto, observou-se um aumento nos níveis de cálcio e TSH nas fêmeas tratadas com 500mg/kg. Embora os hormônios (TSH e T4) avaliados não foram alterados nos filhotes, houve um aumento no peso corporal dos filhotes cujas mães foram tratadas com o extrato. Todos os machos tratados com o extrato foram capazes de copular com as fêmeas. No entanto, após a contagem de espermatozoides, foi observada uma diminuição significativa no número de espermátides no testículo e na produção diária espermática dos animais expostos a 500 e 750 mg/kg de extrato. Nossos resultados sugerem que o extrato etanólico das flores de *A. satureioides* foi tóxico para o sistema reprodutor masculino, já que importantes parâmetros reprodutivos masculinos foram afetados pelo tratamento, sem comprometer a fertilidade dos mesmos. Além disso, o extrato parece ter afetado o eixo Hipotálamo-hipófise-tireoide das mães expostas.

Palavras-chave: *Achyrocline satureioides*; toxicidade de doses repetidas; toxicidade reprodutiva

ABSTRACT

Achyrocline satureioides (LAM) D.C., popularly known as "macela", is a species very used in folk medicine, and their parts are used in the form of infusion and decoction with several medicinal purposes, such as, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, among others. However, there is little information available in the literature regarding the toxic effects of this species. Thus, considering its therapeutic potential versus a lack of studies of its toxicity, the aim of this study was to evaluate the effects of the exposure to the ethanolic extract of *A. satureioides* flowers during the pre-gestational, gestational and postpartum period in Wistar rats, through reproductive and developmental parameters. The animals were divided into 4 experimental groups: three groups received doses of 250, 500 or 750 mg/kg of extract, orally (gavage), while 1 group received vehicle (control group). The treatment with *A. sauteiroides* extract included three periods (pre-mating, mating and post-mating). Male adult rats were treated for 28 days (2 weeks before mating, during mating and, 2 weeks after mating), while the adult females were treated 2 weeks before mating, during mating, during pregnancy and 13 days of lactation. After treatment, the animals were killed and reproductive and developmental parameters were evaluated. After phytochemical analysis, substances as quercetin, luteolin, among others, were found in this extract. All parameters analysed in the females were not altered by the extract. However, it was observed an increase in the calcium and TSH levels in the treated-dams. Although the hormones (TSH and T4) evaluated were not altered in pups, there was an increase in the body weight of the pups whose mothers were treated with the extract. All males treated with the extract were able to copulate with the females. However, after sperm count, a significant decrease in the number of spermatids in the testis and in the daily sperm production of animals exposed to 500 and 750 mg/kg of extract was observed. Our results suggest that the ethanolic extract of *A. satureioides* flowers was toxic to the male reproductive system, since important male reproductive parameters were affected by the treatment, without compromising their fertility. In addition, the extract appears to have affected the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of the exposed mothers.

Keywords: *Achyrocline satureioides*; repeated dose toxicity; reproductive toxicity

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Plantas Medicinais	11
2.2 <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam) DC., Asteraceae	12
2.2.1 <i>Caracterização da espécie Achyrocline satureioides</i>	12
2.2.2 <i>Propriedades Biológicas</i>	13
2.3 Estudos Toxicológicos	15
2.3.1 <i>Toxicidade de doses repetidas</i>	17
2.3.2 <i>Toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento</i>	18
3 OBJETIVOS	20
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
5 APÊNDICES	25
5.1 Artigo: Reproductive and developmental toxicity of ethanolic extract from <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) D.C. flowers in rats	26
6 ANEXOS	50
6.1 Parecer de aprovação do CEUA	50

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, plantas têm sido utilizadas pelo homem com o intuito de cura ou alívio das mais diversas enfermidades. Ao longo dos anos, as descobertas do poder curativo de várias espécies de plantas tornaram-se um fator de extrema importância, resultando na sistematização de seu uso (SILVA, 2006).

Achyrocline satureioides (Lam.) DC, da família *Asteraceae* e conhecida popularmente como “macela ou macela do campo”, é uma planta anual, aromática com inflorescências terminais muito comuns em pastagens e beira de estradas (TESKE; TRENTINI, 2001). Nativa da América do Sul, essa espécie é encontrada em todo o Brasil (CORREA, 1984), com exceção da região Amazônica (TESKE; TRENTINI, 2001). Várias propriedades biológicas têm sido atribuídas a esta espécie, tais como atividades anti-inflamatória (DE SOUZA *et al.*, 2007), sedativa, hepatoprotetora (KADARIAN *et al.*, 2002) antioxidante (POLYDORO *et al.*, 2004; ARREDONDO *et al.*, 2004; MORQUIO *et al.*, 2005), imunomodulatória e antimicrobiana (CALVO *et al.*, 2006), antitumoral (RUFFA *et al.*, 2002), antiviral (ZANON *et al.*, 1999; BETTEGA *et al.*, 2004) e vasorelaxante (HNATYSZYN *et al.*, 2004),;. Esta planta é popularmente usada em infusões, maceração em água fria, decocção e como xarope (GARCIA *et al.*, 1990; CROVETTO, 1981; PAZ *et al.*, 1992). Além disso, é tradicionalmente usada como antiespasmódicos em doenças intestinais e em distúrbios gástricos e respiratórios (FILOT DA SILVA *et al.*, 1994; TAYLOR, 2005).

Embora muitos estudos comprovem a eficácia terapêutica da *A. satureioides*, poucos estudos avaliaram seu perfil toxicológico, especialmente na função reprodutiva. Em estudo realizado por Caridid *et al.* (2015), empregando extrato aquoso quente, houve evidência de efeitos genotóxicos sobre a medula óssea de ratos nas doses de 200 e 500 mg/kg administradas por via intraperitoneal. Além disso, foram observadas concentrações mais elevadas de flavonóides, comparadas ao extrato aquoso frio. Esses autores sugerem que os efeitos tóxicos do extrato quente podem ser devido a maior quantidade de flavonóides, sendo assim, sua administração deve ser controlada.

Embora a *Achyrocline satureioides* seja uma planta muito utilizada na medicina popular e tenha muitas propriedades biológicas comprovadas cientificamente, há poucos relatos na literatura de estudos de toxicidade dessa espécie. Não há conhecimento dos possíveis efeitos teratogênicos, fetotóxicos ou maternotóxicos, e nem informações se seu uso contínuo por homens e mulheres pode comprometer sua capacidade fértil.

Assim, as informações obtidas no presente trabalho poderão contribuir para a utilização dessa espécie na medicina tradicional de forma segura, ao mesmo tempo em que dará suporte para mais testes de atividades farmacológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

Plantas têm sido utilizadas por séculos pela humanidade com a finalidade de cura ou tratamento de diversas doenças. Em função dos efeitos terapêuticos produzidos por extratos vegetais, vários medicamentos devem sua origem às plantas medicinais. Conseqüentemente, a descoberta de medicamentos a partir das mesmas permanece ainda uma área importante, até então inexplorada. Em que, a exploração científica pode fornecer informações relevantes sobre vários alvos farmacológicos (SEM; SAMANTA, 2015).

De acordo com Simões *et al.* (2004), devido à limitação de medicamentos frente a algumas enfermidades, plantas medicinais vêm tornando-se uma importante alternativa à produção de novos fármacos, destacando-se assim, os fitoterápicos. Pela resolução n° 17 de 24 de fevereiro de 2000, medicamentos fitoterápicos são medicamentos farmacêuticos obtidos por processo tecnologicamente adequado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade de cura, prevenção ou para fins de diagnósticos de patologias. São caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como a constância de sua qualidade (SILVA, 2006).

Entre os adeptos da fitoterapia, é comum o pensamento de que esses medicamentos são eficazes e seguros, podendo inclusive induzir à automedicação com plantas medicinais (SIMÕES *et al.*, 2004). De acordo com Turolla e Nascimento *et al.*, (2006), o uso tradicional de diversas plantas medicinais estabelecido por conhecimento popular, fez com que poucas delas fossem avaliadas em ensaios pré-clínicos e clínicos no que se refere à sua eficácia, reações adversas e toxicidade. Neste sentido, pouco se conhece sobre a segurança e confiabilidade da maioria das plantas utilizadas pela população como medicinais (FIRMO *et al.*, 2011). Dessa forma, tão importante quanto

o conhecimento popular, a sua unificação com o meio científico gera a validação das suas propriedades farmacológicas, e minimização dos seus efeitos toxicológicos.

A utilização de plantas medicinais por diversas populações é uma prática comum. Entretanto, a falta de informações sobre os efeitos adversos dessas plantas gera questões sobre a sua segurança. Assim, estudos avaliando os efeitos tóxicos em animais prenhes são necessários, mesmo para plantas utilizadas tradicionalmente, já que não há dados da maioria das espécies medicinais sobre a sua segurança, principalmente se utilizadas durante o período gestacional (KHALKI *et al.*, 2010).

2.2 *Achyrocline satureioides* (Lam) DC., Asteraceae

2.2.1 Caracterização da espécie *Achyrocline satureioides*

Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. (Figura 1), conhecida popularmente como “macela ou macela do campo”, é uma planta nativa da América do Sul. Esta espécie cresce em todo o Brasil, com exceção da região Amazônica (TESKE; TRENTINI, 2001; CORREA, 1984).



Figura 1 – Flores de *Achyrocline satureioides*. Fonte: O AUTOR

A *A. satureioides* é uma planta anual, aromática com inflorescências terminais muito comuns em pastagens e beira de estradas (TESKE; TRENTINI, 2001). Ocorre em campo sujo, campo limpo e cerrado (ALMEIDA *et al.*, 1998). É pouco exigente quanto ao solo, porém, desenvolve-se melhor em solo fértil e com boa umidade. Seu florescimento ocorre de dezembro a maio (SILVA JÚNIOR, 2006), enquanto sua frutificação ocorre o ano todo (ALMEIDA *et al.*, 1998). Nos estados do sul, esta planta é amplamente empregada com ação medicinal (SIMÕES *et al.*, 1986), estabelecendo interesse regional (LANGELOH; SCHENKEL, 1987). Como a floração se dá até o outono, é tradição na região do Rio Grande do Sul colher suas flores na sexta-feira santa (TESKE; TRENTINI, 2001).

2.2.3 Propriedades biológicas

As propriedades biológicas atribuídas a esta espécie, são anti-inflamatória (DE SOUZA *et al.*, 2007); hepatoprotetora (KADARIAN *et al.*, 2002) antioxidante (ARREDONDO *et al.*, 2004; MORQUIO *et al.*, 2005), antimicrobiana (CALVO *et al.*, 2006), e antiviral (ZANON *et al.*, 1999; BETTEGA *et al.*, 2004; SABINI *et al.*, 2010; SALGUEIRO *et al.*, 2016). Esse vegetal é popularmente consumido em infusões, maceração em água fria, decocção e como xarope (GARCIA *et al.*, 1990; CROVETTO, 1981; PAZ *et al.*, 1992).

Geralmente, essa planta é utilizada como medicamento na forma de chá, em uma dosagem de 10 g de flores em 1 litro de água, tomando-se de 3 a 4 xícaras ao dia; para uso externo, aplica-se na forma de compressa, numa dosagem de 30 g de flores em 1 litro de água (CARVALHO; ALMANÇA, 2005). Como fitocosmético, utiliza-se em xampus e sabonetes 2 a 5% de extrato glicólico (TESKE; TRENTINI, 2001). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que a infusão de suas flores seja preparada numa quantidade de 1,5g em 150 mL de água, com administração de 3-4 vezes ao dia, em pessoas acima de 12 anos de idade (BRASIL, 2011).

Tem sido demonstrado que a atividade anti-inflamatória dos extratos aquoso e hidroetanólico das inflorescências de *A. satureioides* se deva ao alto teor de flavonóides presentes nesse vegetal, tais como quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina. Esse efeito deve-se, em parte, à inibição da enzima ciclooxigenase (COX) pelos flavonóides (SIMÕES *et al.*, 2004). A atividade anti-inflamatória também foi verificada em

pesquisa pré-clínica do Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos (BRASIL, 2006).

A presença de flavonóides também confere à *A. saturoioides* atividade antioxidante (PERUCHI *et al.*, 2005; PERUCHI; MEIRELES, 2006). Estudos realizados por Arredondo *et al.* (2004) demonstraram atividade citoprotetora após administração de infusão de *A. saturoioides* contra o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células PC 12. As atividades antioxidante e citoprotetora relacionadas à *A. saturoioides* podem recomendá-la como auxiliar na prevenção de doenças neurodegenerativas (BRASIL, 2006).

De acordo com Morquio *et al.* (2005), preparações cosméticas contendo *A. saturoioides* foram capazes de reduzir a produção de imagem do radical hidroxilo (OH) após a irradiação ultravioleta (UV), medindo o ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3-DHBA), em coelhos, provavelmente devido a presença de flavonóides do vegetal. Esses autores concluíram que o uso de antioxidantes tópicos, como o extrato de *A. saturoioides* pode ser benéfico para o fotoenvelhecimento e eventualmente, câncer de pele.

Já, a atividade antiviral deve-se a presença de 3-O-metilflavonas (TESKE; TRENTINI, 2001), quercetina, ácido caféico, luteolina, quercetina 3-O-metil éter e seus derivados (SILVA JÚNIOR, 2006). Quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina, são também amplamente estudados para terapia anticancerígena. A Achyrobicalcone, recentemente isolada de *A. saturoioides*, também pode representar uma biomolécula quimioterapêutica promissora devido à sua similaridade com outras bicalconas citotóxicas para linhagens celulares de câncer (CARINI *et al.* 2014). A saponina inibe a síntese do DNA do vírus herpético tipo 1 (TESKE; TRENTINI, 2001). De acordo com estudos de Bettega *et al.* (2004), a atividade anti-herpética de extrato hidroalcoólico do vegetal ocorreu entre as segundas e nonas horas do ciclo de replicação do vírus, ocasionando uma perturbação nos estágios tardios deste ciclo.

Estudos realizados por Langeloh e Schenkel (1987), demonstram o efeito antiespasmódico de extrato hidroalcoólico de *A. saturoioides* sobre contrações induzidas por noradrenalina e cloreto de bário no ducto deferente de rato, agindo como antagonista não competitivo e irreversível. Simões *et al.* (1988), relata significativo efeito analgésico do extrato aquoso e macerado etanólico do vegetal em testes com

camundongos. Segundo experimentos realizados em ratos e camundongos por Simões *et al.* (1986), evidenciou-se que o extrato aquoso das folhas/caules de *A. satureioides* possui atividade colinolítica e miorelaxante, bem como efeito sedativo central. Teske e Trentini (2001) também relatam a atividade colinolítica, miorelaxante e efeito sedativo central com estudos do extrato aquoso do vegetal.

Embora muitos estudos comprovem a eficácia terapêutica da *A. satureioides*, poucos estudos avaliaram seu perfil toxicológico, especialmente na função reprodutiva. Rivera *et al.* (2004) observaram que o extrato aquoso da *A. satureioides*, administrado intraperitonealmente ou via oral em camundongos e ratos apresentou baixa toxicidade aguda, sendo a DL₅₀ (Dose Letal que corresponde à dose capaz de matar 50% dos animais em teste) maior que 5g/kg, por via oral em ratos.

Estudos realizados por Sabini *et al.* (2013), utilizando as concentrações administradas popularmente em aperitivo ou infusão, não demonstraram qualquer efeito genotóxico ou citotóxico do extrato aquoso frio de *A. satureioides*. Entretanto, em estudos de Caridid *et al.* (2015) com extrato aquoso quente, houve evidência de efeitos genotóxicos sobre a medula óssea de ratos tratados por via intraperitoneal, nas doses de 200 e 500 mg/kg e também apresentaram concentrações mais elevadas de flavonóides, comparadas ao extrato aquoso frio. Esses autores sugerem que os efeitos tóxicos do extrato quente podem estar relacionado a maior quantidade de flavonóides sendo assim, por este tipo de extrato ser o mais utilizado na medicina popular, sua administração deve ser controlada.

Salgueiro *et al.* (2016) demonstraram em estudo *in vitro* que a infusão de *A. satureioides*, apresentou em espécie *Artemia salina*, DL₅₀ de 2,06 mg/mL, sendo assim, maior que 1000 µg/ml no referido estudo, foi considerada não-tóxica. Além disso, após ensaio de cometa, essa espécie não exibiu potencial genotóxico em linfócitos humanos. Os componentes majoritários encontrados no extrato bruto foram: isoquercetina, quercetina e ácido caféico; esses compostos estão numa escala de possíveis riscos de toxicidade. Esse fato demonstra a necessidade de mais estudos toxicológicos desta importante espécie medicinal.

2.3 Estudos toxicológicos

A toxicidade é o potencial de um agente em provocar efeitos nocivos em organismos vivos. Geralmente, envolve uma série de eventos, iniciando com a exposição ao agente, seguida pela distribuição, metabolização e interação com macromoléculas; gerando a ação tóxica. A via de administração, a duração e a frequência da exposição são algumas das condições de exposição à xenobióticos que interferem ou não, no aparecimento de efeitos nocivos (OGA *et al.*, 2008).

Segundo Klassen *et al.* (2012), plantas contêm substâncias que podem provocar efeitos tóxicos no fígado, rins, pulmões, pele, sistema cardiovascular e sistema reprodutivo. De acordo com Morton (1998), o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes e seguros para o homem, dependem de estudos de toxicologia em animais pré-estabelecidos e cuidadosamente executados.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabeleceu um guia para a condução de estudos não-clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Esse guia é baseado em protocolos de agências regulamentadoras de interesse na área e reconhecidas internacionalmente, entre elas a Food and Drug Administration (FDA); Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD); World Health Organization (WHO). Esses guias, contêm todos os parâmetros necessários para a avaliação toxicológica pré-clínica, de medicamentos, incluindo os fitoterápicos (ANVISA, 2013).

Ensaio não-clínicos de segurança de substâncias incluem estudos de toxicidade de dose única (Aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, carcinogenicidade, entre outros. Nos estudos de doses repetidas, pode-se obter informações sobre efeitos tóxicos e identificar órgãos alvos (ANVISA, 2011). Parâmetros de letalidade aguda, como a DL_{50} , podem não determinar o espectro de toxicidade de uma substância, já que, algumas com baixa toxicidade aguda, podem ter efeitos teratogênicos ou cancerígenos em dosagens que não produzem nenhuma evidência de toxicidade aguda (KLASSEN *et al.*, 2012).

A escolha da metodologia em testes toxicológicos em ensaios pré-clínicos é realizada conforme as informações toxicológicas disponíveis e sua relevância no estudo proposto (EMA, 2007). Segundo Dorato e Buckley (2006), testes de toxicidade utilizando modelos animais tem a finalidade de traduzir as respostas para uma compreensão dos riscos para seres humanos. Para isso, o pesquisador deve estar atento

às diretrizes internacionais para avaliação da segurança de substâncias. Dessa forma, de acordo com Oga *et al.* (2008), os efeitos de um composto químico em animais são métodos válidos e essenciais para a descoberta dos efeitos nocivos no homem, bem como, podem fornecer dados confiáveis que darão suporte para futuras pesquisas clínicas (ANVISA, 2010).

Os animais utilizados em estudos de toxicidade devem ser saudáveis, de espécie conhecida, e possuir idade e peso adequados ao experimento (ANVISA, 2013). Morton (1998) relata que é de suma importância a seleção das espécies de laboratório mais apropriada e relevante para o referido estudo.

2.3.1 Toxicidade de doses repetidas

Os estudos de toxicidade doses repetidas são realizados para obter-se informações sobre a toxicidade de uma substância após a administração repetida, bem como identificar e caracterizar um determinado órgão ou órgãos afetados pela mesma após os ensaios (KLASSEM *et al.*, 2012), e ainda, seus efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas e histopatológicas e também informações sobre a indicação do Nível de Efeito Adverso Não Observado (NOAEL) e Nível de Efeito Não Observado (NOEL) (ANVISA, 2011).

Seu estudo é delineado a partir de resultados obtidos de pesquisa de toxicidade aguda (única exposição), principalmente no que se refere a escolha das dose. É um estudo importante porque muitas vezes, é o primeiro e único teste com doses repetidas a ser realizado por uma substância química. O ensaio de toxicidade subaguda também é importante no que se refere a determinadas alterações fisiológicas, necessitando de testes mais específicos futuramente (OGA *et al.*, 2008).

O protocolo da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) – Guideline 407 (2008) preconiza o estudo de dose repetida de 28 dias em roedores parainvestigar os efeitos sobre possíveis alvos de toxicidade. Dessa forma, fornece informações sobre possíveis riscos para a saúde após uma exposição repetida num período de tempo limitado de determinado produto químico, bem como pode fornecer dados se o mesmo afeta a fisiologia da tireóide, órgãos reprodutores masculinos e/ ou feminino em animais adultos e jovens e efeitos imunológicos. Este protocolo pode anteceder outros estudos de toxicidade (ANVISA, 2013).

Ao final do ensaio, os órgãos e tecidos são retirados e avaliados macroscopicamente e microscopicamente; amostras de sangue também são obtidas e analisadas de todos os grupos de teste. A maioria dos agentes químicos que produzem toxicidade sistêmica agem em um ou mais órgãos. Os órgãos-alvos geralmente são: pulmão, sangue e sistema hematopoiético, fígado e rins. Esses dois últimos, concentram-se mais toxicantes do que os demais, devido a uma alta capacidade de ligação com várias substâncias. As análises hematológicas incluem hematócrito, dosagem de hemoglobina, contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas. Os parâmetros bioquímicos incluem a dosagem de cálcio, potássio, ureia, creatinina, proteínas totais, colesterol, triglicerídeos, glicose, bilirrubina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT). AST e ALT estão distribuídas amplamente nos tecidos humanos. Entretanto, a ALT é uma enzima de especificidade hepática, apresentando-se normal após o infarto do miocárdio, e elevada em lesão hepática (KLASSEN *et al.*, 2012). Na avaliação da função renal, estão incluídos as dosagens de ureia e creatinina no plasma sanguíneo (SCHOSSLER *et al.*, 2001).

A análise histopatológica em ensaios de toxicidade tem por finalidade avaliar a integridade tecidual dos órgãos extraídos. Como lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose e apoptose), infiltração de leucócitos, extravasamento de sangue e fibrose (CUNHA *et al.*, 2009).

2.3.2 Toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento

A toxicologia reprodutiva estuda os efeitos adversos no sistema reprodutor masculino e feminino ocasionados pela exposição a substâncias químicas ou físicas. A toxicologia do desenvolvimento estuda os efeitos adversos sobre organismos em desenvolvimento oriundos da exposição a substâncias químicas antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou após o nascimento. Alguns sítios de interferência de xenobióticos no ciclo reprodutivo feminino são: ovogênese, ovocitação, coito, transporte de gametas e zigoto, fertilização, implantação do embrião. Já no órgão reprodutor masculino são: a espermatogênese, a secreção de hormônios e função de órgãos acessórios (KLASSEN *et al.*, 2012).

A exposição à algumas substâncias possivelmente tóxicas, durante a fase pré e perinatal de mamíferos, podem alterar o sistema reprodutivo, sem manifestações

aparentes na prole, ocasionando efeitos que se tornem evidentes posteriormente, já na fase adulta (NEUBERT; CHAHOUD, 1995).

Diferentes condições de exposição à substância teste devem avaliar o parâmetro do estudo, como a administração da mesma em machos e/ou fêmeas no período de pré-acasalamento; bem como a administração em animais prenhes, que pode englobar a avaliação da fertilidade, potencial teratogênico, toxicidade peri e pós-natal. Nos machos o ciclo inteiro da espermatogênese deve estar incluído nos testes. Algumas alterações no ciclo reprodutivo requerem estudos de gerações posteriores (OGA *et al.*, 2008)

De acordo com a Anvisa (2011), os estudos de toxicidade reprodutiva devem avaliar as seguintes fases: fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial; desenvolvimento pré e pós-natal, e embrio-fetal. O modelo animal preferível são ratos. As interpretações dos resultados devem estar correlacionados com outros dados toxicológicos e farmacológicos disponíveis. A via de administração é a mesma pretendida para uso em humanos. As doses e o período de administração são embasados em estudos de toxicidades de doses repetidas. Ao estabelecer-se a dose mais alta, as demais devem ser descendentes, os intervalos entre elas podem ser baseados em outros quesitos de toxicidade e farmacocinética.

O protocolo da OECD – 421 (2015), foi projetado para abordar os efeitos de uma substância teste sobre o desempenho reprodutivo masculino e feminino, como função gonadal, comportamento durante o acasalamento, concepção e desenvolvimento do conceito. Essa diretriz fornece informações iniciais sobre os possíveis efeitos sobre a reprodução e/ou desenvolvimento, através da detecção de manifestação pós-natal de exposição pré-natal ou efeitos que podem ser induzidos durante a exposição pós-natal. Em machos, a administração pré-acasalamento de duas semanas, observações de acasalamento e fertilidade com um período de tratamento de pelo menos quatro semanas, seguida de histopatologia das gônadas masculinas, é considerada suficiente para permitir a detecção de alterações sobre a fertilidade masculina e espermatogênese. Em fêmeas, a administração pré-acasalamento visa cobrir pelo menos dois ciclos estrais completos, o tempo de concepção, a duração da prenhez e treze dias após o parto. Os achados do estudo incluem a presença, incidência e gravidade das anormalidades, alterações em órgão-alvos, infertilidade, desempenho reprodutivo e ninhada afetada, morte; entre outros sinais de toxicidade.

Embora a *Achyrocline satureioides* seja uma planta muito utilizada na medicina popular e tenha muitas propriedades biológicas comprovadas cientificamente, há poucos relatos na literatura de estudos de toxicidade dessa espécie. Não há conhecimento dos possíveis efeitos teratogênicos, fetotóxicos ou maternotóxicos, e nem informações se seu uso contínuo por homens e mulheres pode comprometer sua capacidade fértil. Assim, as informações obtidas no presente trabalho poderão contribuir para a utilização dessa espécie na medicina tradicional de forma segura, ao mesmo tempo em que dá suporte para mais testes de atividades farmacológicas.

3 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a influência da exposição ao extrato etanólico das flores de *Achyrocline satureioides* durante os períodos pré-gestacional, gestacional e pós-parto em ratos Wistar, através de avaliações de parâmetros reprodutivos e do desenvolvimento.

ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do extrato etanólico obtido das flores de *Achyrocline satureioides* no desempenho reprodutivo de ratos machos e fêmeas;

Avaliar os efeitos tóxicos maternos e da prole, através da análise de parâmetros bioquímicos, hematológicos e hormonais;

Avaliar possíveis alterações comportamentais, no parto, no tamanho da ninhada, no número de filhotes vivos ou mortos, sexo dos filhotes, peso corporal e a presença de malformações;

Avaliar a toxicidade de doses repetidas e reprodutiva nos machos adultos, através da análise de parâmetros bioquímicos, hematológicos, hormonais e espermáticos.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P. de *et al.* **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.

- ARREDONDO, M. F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. and some of its main flavonoids against oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, Montevidéo, v. 91, n. 1, p. 13-20, mar. 2004.
- BETTEGA, J. M.R. *et al.* Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. **Research Phytotherapy**, v.18, p. 819–823, 2004.
- BRASIL, ANVISA. Guia para a condução de Estudos não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Brasília: ANVISA, 2010.
- BRASIL, ANVISA. Formulários de Fitoterápicos- Farmacopeia Brasileira. 1. Ed. Brasília, ANVISA, 2011.
- BRASIL, Ministério da Saúde. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- CALVO, D.; CARIDID, L.N.; GROSSO, M.; DEMO, M.S.; MALDONADO, A.M. *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): Antimicrobial activity on *Staphylococcus spp.* and immunomodulating effects on human lymphocytes. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, Rio Cuarto, v. 48, n. 3-4, p. 247-255, jul./dec., 2006.
- CARIDID, L.N.; SABINI, M.C.; ESCOBAR, F.M.; BACCHETTI, R.; MONTIRONI, I.; MERCKIS, C.; REINOSO, E.B.; MONTOYA, S.N.; ZANON, L.R.; COMINI, L.R.; SABINI, L.S. *In Vitro* and *In Vivo* Cytogenotoxic Effects of Hot Aqueous Extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **BioMed Research International**, v.15, 2015.
- CARINI, J.P.; KLAMT, F.; BASSANI, V.L. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. **RSC Advances**, v.4, p. 3131-3144, 2014.
- CARVALHO, J. C.; ALMANÇA, C. C. J. **Formulário de prescrição fitoterápica**. São Paulo: Atheneu, 2005.
- CORRÊA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. 5 v.
- CROVETTO, M. R., Plantas utilizadas en medicina en el NO de Corrientes. Ed. **Fundación Miguel Lillo**, Tucumán. Argentina: 1981.
- CUNHA, L.C. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.19, n.2, p.403-411, 2009.
- DA SILVA, F.L.; LANGELO, A. A comparative study of antispasmodic activity of hydroalcoholic 80% (V/V) extracts of *Achyrocline satureioides* (Larn.) DC (Asteraceae) with papaverine and atropine on rat isolated jejunum. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.13, p.35–40, 1994.
- DE SOUZA, K.C.B. *et al.* Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, p.102–108, 2007.

DORATO, M.A.; BUCKLEY, L.A. Toxicology in the drug Discovery and development process. **Current Protocols in Pharmacology**, v.10, p.1–10, 2006.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Guidelines on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with medicinal products, 2007.

FIRMO, W. DA C. A. MENEZES, V. DE J.M.; PASSOS, C.E. DE C.; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L.; DIAS, I.C.L.; NETO, M.S.; OLEA, R.S.G., Uso Popular e Concepção Científica sobre Plantas Medicinais. **Cadernos de Pesquisas (UFMA)**. São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.

GARCIA, G. *et al.* Antiherpetic activity of some Argentine medicinal plants. **Fitoterapia**, v.61, p.542–546, 1990.

HNATYSZYN, O. *et al.* Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus cavernosum. **Phytomedicine**, v.11, p. 366–369, 2004.

KADARIAN, C. *et al.* Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Revista Pharmacology**, v.45, p.57–61, 2002.

KHALKI, L.; SAADIA, B.M.; MOHAMED B.; ABDERRAHMAN, C.; ZAHRA, S. Evaluation of the developmental toxicity of the aqueous extract from *Trigonella foenum-graecum* (L.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 321-325, 2010.

KLAASSEN, C.D.; WATKINS, J.B. **Fundamentos em toxicologia**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

LANGELOH, A.; SCHENKEL, E. P. **Atividade antiespasmódica do extrato alcoólico de marcela (*Achyrocline satureioides*, DC. Compositae) sobre a musculatura lisa genital de ratos**. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 7, 1 a 3 de setembro de 1982, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: ORÉADES, p. 454-458, 1987.

MORQUIO, A. *et al.* Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* (Marcela). **Research Phytotherapy**, v.19, p.486–490, 2005.

MORTON, D.M. Importance of species selection in drug toxicity studies. **Toxicology Letters**, n. 102, p. 545-548, 1998.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I. Possible consequences of pre- or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. **Endocrine Chemical Environment**, v. 3, p. 24-52, 1995.

OGA, S.; CAMARGO, M.M. DE A.; BATISTUZZO, J.A. DE O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Guideline 407, Head of Publications Service, Paris, France, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. Guideline 421, Head of Publications Service, Paris, France, 2015.

PAZ, A.E. *et al.* Uso Racional de las Plantas Medicinales. **Fin de Siglo**, Montevideo, Uruguay, 1992.

PERUCHI, M. P.; BRAGA, M. E. M.; MEIRELES, M. A. de A. Obtenção de extratos de *Achyrocline satureioides* por hidrodestilação, soxhlet, baixa pressão e extração supercrítica. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UNICAMP, 13, 28 a 29 de setembro de 2005, [Campinas]. Disponível em: <<http://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xiiicongresso/resumos/016939.pdf>>. Acesso em: 22 de mar. de 2017.

PERUCHI, M. P.; MEIRELES, M. A. de A. Extração fracionada de macela (*Achyrocline satureioides*) utilizando tecnologia supercrítica. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UNICAMP, 14, 27 a 28 de setembro de 2006, [Campinas]. Disponível em: <<http://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xivcongresso/cdrom/pdfN/199.pdf>>. Acesso em: 22 de mar. de 2017.

POLYDORO, M. *et al.* Antioxidant, a prooxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sci**, v.74, p. 2815–2826, 2004.

RIVERA, F. *et al.* Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela). **Journal of Ethnopharmacology**, Montevideu, v. 95, n. 2, p. 359-362, dec. 2004.

RUFFA, M.J. *et al.* 2002. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p. 335–339, 2002.

SABINI, M.C.; CARIDDI, L.N.; ESCOBAR, F.M.; MANAS, F.; COMINI, L.; REINOSO, E.; SUTIL, S.B.; ACOSTA, A.C.; MONTOYA, S.N.; CONTIGIANI, M.S.; ZANON, S.M.; SABINI, L.I. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 463-470, 2013.

SABINI, M. C.; ESCOBAR, F.M.; TONN, C.E.; ZANON, S.M; CONTIGIANI, S.M. Evaluation of antiviral activity of aqueous extracts from *A. satureioides* against Western Equine Encephalitis virus. **Research Natural Product**, v. 10, 2010.

SALGUEIRO, A.C.F.; FOLMER, V.; DA SILVA, M.P.; MENDEZ, A.S.L; ZEMOLIN, A.P.P.; POSSER, T.; FRANCO, J.L. PUNTEL, R.L.; PUNTEL, G.O. Effects of bauhinia forficata tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, v. 9, 2016.

SCHOSSLER, D.; ALEVI, M.M; EMANUELLI M.P., SCHOSSLER, J.P. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de *flunixin meglumine* e Ketoprofeno durante e trans e pós-operatório. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. n. 1, p. 46-51, 2001.

SEM, T.; SAMANTA, S.K. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.147, p. 59-110, 2005.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SILVA JÚNIOR, A. A. **Essentia herba - plantas bioativas**. Florianópolis: Epagril, 2006. 2v.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; RECH, N.; LAPA, A.J. Investigação farmacológica do extrato aquoso de folhas/caules de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae (marcela). **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 2, n.1, p. 37 – 54, 1986.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam) DC., Compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, Porto Alegre, v. 22, n. 3, p. 281-293, abr. 1988.

TAYLOR, L. **The healing power of rainforest herbs: a guide to understanding and using herbal medicinals**. Garden City Park, NY: Square One, 2005.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. 4. ed. Curitiba: Herbarium Lab. Bot. LTDA, 2002.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, abr./jun., 2006

ZANON, S.M.; CERIATTI, F.S.; ROVERA, M.; SABINI L.J.; RAMOS; B.A. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v.41, n. 2, abr/1999.

5 APÊNDICE

O presente trabalho deu origem ao manuscrito intitulado “Reproductive and developmental toxicity of ethanolic extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. flowers in rats”, que será submetido à Revista Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, Fator de Impacto: 2.731

Normas da revista:

<http://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?page=instructions&journalCode=uteh20>

Reproductive and developmental toxicity of ethanolic extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. flowers in rats.

Marcela Dias Maciel¹, Leonardo Cesar Lima Inocêncio², Mayra Schimidt Richsteiner², Flavia Carina Zanatta², Barbara Campos Jorge², Paola da Silva Balin², Silvia Cristina Heredia Vieira³, Gabriela Lessa de Almeida⁴, Claudia Andrea Lima Cardoso⁴, Maria do Carmo Vieira¹, Cândida Aparecida Leite Kassuya¹, Arielle Cristina Arena^{2*}

¹Federal University of Grande Dourados - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil.

²Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP –São Paulo State University Estadual Paulista - Botucatu, São Paulo State, Brazil.

³Anhanguera Faculty of Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil.

⁴Center for Natural Resource Studies, Mato Grosso do Sul State University (UEMS) - Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil.

*Author for correspondence:

Arielle Cristina Arena

Address: Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu,

São Paulo State University (UNESP), Distrito de Rubião Junior, s/n, Caixa Postal – 510;

CEP: 18618970; Botucatu – SP.

Tel: + 55 14 38800495

E-mail address: arielle.arena@unesp.br (A. C. Arena)

Running Title: Developmental toxicity of *Achyrocline satureioides*.

ABSTRACT

Achyrocline satureioides (LAM) D.C., is a species very used in folk medicine with several medicinal purposes. Considering its therapeutic potential versus a lack of studies of its toxicity, this study evaluated the effects of the exposure to the ethanolic extract of *A. satureioides* flowers during the pre-gestational, gestational and postpartum period in rats, through reproductive and developmental parameters. The animals were divided into 4 groups: three groups received doses of 250, 500 or 750 mg/kg of extract, orally, and 1 group received vehicle (control group). The treatment included three periods (pre-mating, mating and post-mating). Phytochemical analysis revealed the presence of important flavonoids (quercetin, luteolin, among others). All parameters analysed in the females were not altered by the extract. However, it was observed an increase in the calcium and TSH levels in the treated-dams. Although the thyroid hormones evaluated were not altered in pups, there was an increase in the body weight of the pups whose mothers were treated with the extract. All males treated were able to copulate with the treated-females. However, the animals exposed to 500 and 750 mg/kg of extract presented a significant decrease in the spermatids number in the testis and in the daily sperm production. Thus, the ethanolic extract of *A. satureioides* flowers was toxic to the male reproductive system, since important sperm parameters were affected by the treatment, without compromising their fertility. In addition, the extract appears to have affected the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of the exposed mothers.

Keywords: *Achyrocline satureioides*; Subacute toxicity; Fertility; Embryo; Rats.

1. INTRODUCTION

The prenatal and early postnatal is a period highly influenced by adverse effects. The exposure to several factors such as drugs, stress, malnutrition, diseases, or chemicals during this period can compromise the development of the fetus and lead to defects in offspring (Boersma et al., 2014). Since herbal medicines are traditionally considered safe by the population, pregnant women make use of natural products to heal several symptoms (Holst et al., 2009). However, there is a little scientific information about the undesirable maternal and perinatal consequences of their use.

Achyrocline satureioides (Lam.) De Candolle (family Asteraceae) popularly known as “macela or marcela”, is a suffrutex, perennial, aromatic plant that is distributed mainly in tropical and subtropical regions of South America (Deble, 2007; Retta et al., 2012). This species has been used for a long time by native populations (Retta et al., 2012). The parts of this plant are prepared in form of decoction, infusion, macerate in cold water and as syrup, and integrate the formula of some consumer beverages (Alonso Paz et al., 1992; Petenatti et al., 2004).

Several medicinal properties are attributed to this plant, such as anti-inflammatory, menstrual regulator, antispasmodic, analgesic, constipating, antioxidant and antimicrobial (Filot Da Silva & Langeloh, 1994; Langeloh; Schenkel, 1987; Teske et al., 2001; Silva Junior, 2006). According to Almeida et al. (1998), its flowers also protect against respiratory diseases and hypertension. These medicinal effects have been proven by several *in vivo* and *in vitro* studies (Retta et al., 2012).

Phytochemical analyses revealed that the flavonoids quercetin, 3-O-methylquercetin and luteolin are the main components extracted from the *Achyrocline satureioides* inflorescences (De Souza et al., 2007). Other constituents found in this species are caffeic acid, protocatechuic acid, triterpenoid saponins, sesquiterpene and

polysaccharides (Teske et al., 2001; Silva Junior, 2006). According to Peruchi et al. (2005), extraction methodologies that employ ethanol present higher concentrations of quercetin and phenolic compounds.

Despite *A. satureioides* being considered a promising medicinal plant, little information is available in the scientific literature on their toxic effects (Rivera et al., 2004). The aqueous extract of *A. satureioides* presented low toxicity after *in vitro* and *in vivo* studies (Rivera et al., 2004, Salgueiro et al., 2016), suggesting that the LD₅₀ is higher than 5g/kg in rats (Rivera et al., 2004). However, in a study conducted by Sabini et al. (2013), the LD₅₀ of a cold aqueous extract of *A. satureioides* was lower (500 mg/kg, ip) in mice and the surviving animals in the groups treated with 500 and 750 mg/kg showed signs of toxicity, such as hypothermia and weakness. These data indicate the need for further toxicological studies.

Considering the therapeutic potential described for *A. satureioides* versus its scarcity of toxic studies, the aim of this study was to investigate the effects of the ethanolic extract from *A. satureioides* flowers during pre-gestation, prenatal and early postnatal periods in rats.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Vegetal material and preparation of ethanolic extract

Achyrocline satureioides flowers were collected in the Medicinal Plant Garden (HPM), Federal University of Grande Dourados (UFGD), Dourados-MS (latitude 22° 11' 43.7" south, longitude W 54° 56' 08.9" West, and altitude 452 m), in April 2015 and posteriorly identified by Dr. Maria do Carmo Vieira. The voucher specimen was

deposited in the CGMS herbarium of the Federal University of the Mato Grosso do Sul, Brazil (number 5683).

The flowers were dried naturally, and then crushed in a Wiley type mill with a 10 mesh screen. The ethanolic extract was obtained by maceration, and for each 5.0 g of the dried and milled plant, 100 mL of ethanol 95% were used. The plant was left in contact with ethanol for 72 h at room temperature. Posteriorly, the solid part of extract was filtered on filter paper and solvent was added again in the same ratio as above, and this process was repeated four consecutive times. Then, the extract was lyophilized. The dried extracts were redissolved in saline solution to obtain diferents concentrations.

2.2. Phytochemical analysis

The extract (5 mg) was solubilized in 10 mL of methanol: water 40:60 v: v. The solution was filtered on membrane filter with a 0.45 μm (Millipore, MA, EUA). Then, the extract was analysed on an analytical HPLC system (LC-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) with a diode array detector (DAD) with scanning from 200 to 800 nm. The LC column was a C-18 (25 cm x 4.6 mm; particle size, 5 μm ; Luna, Phenomenex, Torrance, CA, EUA). The flow rate was 1.0 mL/minute, and the volume injected was 10 μL . Elution was performed using mobile phase with acetic acid and sodium acetate (eluent A) and acetonitrile (eluent B). Standards of quercetin, luteolin, ferulic and caffeic acid (Sigma, ~ 97%) were prepared in the initial concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$. Compound concentrations were determined by external calibration after appropriate dilutions in the range of 0.10-50 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The procedure was performed in triplicate and at 22 $^{\circ}\text{C}$.

2.3. Animals

All animals experiments were performed in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal

Experimentation and were only carried out after the approval by the Ethics Committee for Animal Experimentation at the Institute of Biosciences of Botucatu/UNESP (Protocol number: 1026/2017). Male (90 days old, 450g, n=32) and female Wistar rats (60 days old, nulliparous, 250g, n=32) were obtained from the Central Biotherium of São Paulo State University (UNESP). The animals were housed under controlled conditions (ventilated room, 23°C, 12 h light-dark cycle and food and water *ad libitum*).

2.4. Reproduction/developmental toxicity screening test

2.4.1. Experimental design

This study was performed according to Guideline 421 (OECD, 2015). The objective of this guideline is providing initial information on possible effects on reproduction and/or development, either at an early stage of assessing the toxicological properties of chemicals, or on chemicals of concern (OECD, 2015).

The treatment with the ethanolic extract of *A. satureioides* included three periods (pre-mating, mating and post-mating) (Figure 1). Male adult rats (90 days) were treated for 28 consecutive days (two weeks prior to mating, during the mating period and, approximately, two weeks post-mating). The female adult (60 days) was also treated two weeks prior to mating (14 days), during gestational period (21 days) and during lactation until 13 days after delivery. The animals were separated into four experimental groups (n=8 animals/group): three groups received three different doses of extract (250, 500 or 750 mg/kg) by oral gavage and the control group received vehicle (1.0 mL/kg of 0.9% saline). The doses were chosen based on previous studies that used the hydroalcoholic extract of *A. satureioides* (Santin et al., 2010; Da Silva et al., 2016), where the lowest dose (250mg/kg) is similar to the quantity used in the traditional use of this plant. Considering that an adult of approximately 70 kg takes from three to four

times a day an infusion with 5 g of *A. saturoioides* in approximately 200 ml of water, this person ingests of 15g to 20g per day, what represents a consumption of 215 mg/kg or 285 mg/kg/day (Santin et al., 2010). The other doses selected are 2 and 3 times greater than the lowest dose.

2.4.2. Mating procedure

At the end of the 14-day treatment, one male were mated with one female (1:1), during the dark period of the cycle, and the Gestational day (GD) 0 was determined by the presence of sperm in vaginal smears of females in estrus (sexually receptive). Pregnant and lactating rats were maintained in individual cages.

2.4.3. Female treatment and offspring parameters

Two weeks before the beginning of the treatment, the females have been screened for normal estrous cycles. Only rats that showed a regular (4–5 days) estrous cycle were used in this study. The treatment of parental females continues during all gestational period until the day 13 post-partum. Pregnant and lactating rats were weighed daily to calculate the extract volume to be administered and to investigate the clinical signs of toxicity. Behavior changes, signs of difficult or prolonged parturition were recorded. After birth, the number of pups per litter was reduced to eight, 4 males and 4 females, and the following parameters were evaluated: number, body weight and sex of pups, stillbirths, live births, runts and the presence of gross abnormalities. The average anogenital distance (AGD, distance from the anus to the genital tubercle) was measured using Vernier calipers on post-natal (PND) 4 and 13. On PND 4 and 13 (2 pups/litter, 1 male and 1 female) were killed by decapitation and the blood was collected to determine the serum concentrations of thyroid hormones (TSH and T4). On PND 13, the number of areolas was recorded in male pups (OECD, 2015).

Biochemical and hematological parameters: On PND 13, the mothers were killed by decapitation and the blood was collected to biochemical and hematological evaluation. Biochemical parameters were analysed with the semiautomatic BIOPLUS 200 equipment (Gold Analysis Kits) to determine aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT), total protein, albumin, urea, creatinine, calcium, cholesterol, alkaline phosphatase, and glucose. For the hematological analysis some parameters such as leukocyte count total, erythrocytes and platelets count and hematocrit were performed manually, with neubauer chamber. The leukocyte differential count was carried out by blood smear and subsequently the slides were stained with the fast Panoptic kit (Laborclin, Pinhais, Pr).

2.4.4. Male treatment

The males were treated after the mating period until the total dosing period of 28 days has been completed (Guideline 407, OECD, 2008). During treatment, daily body weight, food and water intakes, and possible signs of toxicity were observed and recorded, following the Hippocratic screening. At the end of the observation period, all animals were anesthetized and blood samples were collected from the renal vein with and without anticoagulant (Heparin 5.000 UI/mL, Heparin® - Cristália) for subsequent hematological and biochemical analysis.

After collecting blood, the kidney, liver, testis, epididymis and thyroid of the males were fixed in Bouin's solution for 24 h, embedded in paraplast and sectioned at 5 µm. The sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) and examined under a light microscopy. Any alterations compared to the normal histology were registered (Cunha et al., 2009; Martey et al., 2010).

Sperm morphology evaluation: Sperm were removed from the left vas deferens with a syringe and needle with 1.0 mL of saline formol solution. 200 spermatozoa per animal

were screened and classified using a phase-contrast microscopy (X 200, total magnification) based on criteria described by Filler (1993).

Daily sperm production per testis, sperm number, and transit time in the epididymis:

Step 19 spermatids in the testis (Homogenization-resistant) and sperm in the caput/corpus and cauda epididymis were enumerated as described previously by Robb et al. (1978) with the adaptations adopted by Fernandes et al. (2007). To calculate the sperm transit time through the epididymis, the number of sperm in each portion was divided by the daily sperm production (DSP).

2.4.5. Plasma Hormonal levels

Blood was collected by cardiac puncture to determine the serum concentrations of testosterone, TSH (Thyroid Stimulating Hormone) and T4 (Tyrosine). The serum was obtained by centrifugation (1200 rpm for 20 min at 4 ° C), and the hormone levels were determined by the technique of double antibody radioimmunoassay using specified kits of ImmuChem™ Double Antibody supplied by MP Biomedicals, LLC Diagnostic Division Orangeburg, NY, carried out in the Hospital Universitário da UFGD.

2.5. Statistical analysis

The values are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) or medians (Q1-Q3). Differences were determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test or Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. The significant differences were set at the 0.05 level, using GraphPad Prism Software (San Diego, CA, U.S.A).

3. RESULTS

Phytochemical analysis

The quantification of secondary metabolites in the extract from *A. saturoioides* evidenced the presence of 679.80 of phenolic compounds and 456.20 mg/g of flavonoids. In the chemical characterization performed by HPLC-DAD, it was possible to identify substances such as quercetin, luteolin, caffeic acid, rutine and ferulic acid (Table 1).

Female treatment and offspring parameters

All parameters analysed in the females treated during pre-mating, pregnancy and lactation were not alter by the extract (Tables 2 and 3). The duration of gestation was normal for rats in all experimental groups, as well as there were no significant effects or interactions with size and sex ratio of the litter (Table 4). However, it was observed a significant increase in the body weight of the male offspring treated with 500 mg/kg on DPN 4 and 13 and in the female offspring treated with 500 and 750 mg/kg on DPN 4. Since, the AGD was similar among groups in the all ages evaluated (Table 4). The thyroid hormonal levels (TSH and T4) were not altered. Furthermore, the male and female pups from treated-dams presented thyroid hormonal levels (TSH and T4) similar to the control group in both ages evaluated (Table 5).

The treatment of parental females with the *A. saturoioides* extract since the pre-mating until the day 13 post-partum led to an increase in Calcium and TSH levels only in the group receiving 500 mg/kg of extract, while the other biochemical parameters analysed showed no statistically significant differences in relation to the control group (Table 6).

Male treatment

None of the males exposed to the extract of *A. saturoioides* during the 28-day observation period presented signs of toxicity. The weight gain, the intake of food and water and the organs weights were similar among groups (Tables 2 and 3). In the same

way, the biochemical parameters were unaltered (Table 7). However, after hematological analyses, it was observed an increase in the lymphocytes number of the male exposed to the higher doses (500 and 750 mg/Kg) (Table 7).

All males treated with the extract were able to copulate with the females. However, after the sperm count, a significant decrease in the number of spermatids in the testis and in the daily sperm production of animals exposed to 500 ($p < 0.01$) and 750 mg/kg ($p < 0.05$) of extract were observed. The sperm morphology was not altered by the treatment, while the plasma testosterone level was significantly diminished only in males treated to 500 mg/kg (Table 8).

5. DISCUSSION

The search for alternatives for the treatment of diseases is a reality today, and in this sense, the use of natural products for this purpose has increased. Thus, studies concerning the effects of these products on male and female reproductive performance such as gonadal function, mating behavior, conception, development of the conceptus and parturition should be carried out (OECD, 2015). The present study evaluated the effect of *A. satureioides* ethanolic extract on fertility and development through one generation and the obtained results demonstrated that this extract led to important reproductive alterations especially in male rats which should not be ignored.

Phytochemical evaluation reported the flavonoids quercetin, 3-O-methylquercetin, and luteolin as the main compounds in *A. satureioides* extracts (Carini et al., 2013). These compound classes are responsible for several pharmacological activities, such as the scavenging of reactive oxygen species (ROS) (Carini et al., 2013). This scavenger property is very important considering that ROS and other reactive species have been implicated in the pathology of over 100 human diseases (Halliwell,

2005). Our study confirmed the presence of flavonoids, and quercetin was the majoritary compound found in the extract.

Pregnancy is a condition associated with large physiological changes resulting in numerous pregnancy-related symptoms, including nausea, vomiting, constipation, and heartburn (Lindzon et al., 2011). Many women resort to the use of medicinal plants to alleviate these symptoms and one of the most widely consumed is *A. saturoides* infusion (Retta et al., 2012). In this study, the treatment with the *A. saturoides* extract during pre-mating and pre-natal did not lead to alterations in any parameters evaluated, demonstrating absence of maternal toxicity.

The male and female treated-pups presented an increase in the body weight on PND 4 and 13. These results may be a risk factor for the development of metabolic dysregulation in postnatal life (Taylor et al., 2007). The mechanisms underlying the association between pup high body weight and *A. saturoides* exposure during pregnancy is still unclear, but it can be related to the increase in TSH levels exhibited by the treated-females, since the maternal thyroid hormones supply the fetus throughout pregnancy, and thyroid hormones play a critical role in fetal growth and neurodevelopment (Wang et al., 2014). It is known that flavonoids, like those found in this extract, have the potential to disrupt thyroid hormone metabolism. Since isolated or concentrated flavonoids are increasingly utilized as therapeutic interventions, more research on the potential influence of these substances on thyroid hormone metabolism is desirable.

The administration of a substance during pre-mating period in males is considered sufficient to allow the detection of changes on fertility and spermatogenesis (OECD, 2015). Therefore, we investigated the fertile potential and possible toxicity in males after prolonged exposure (28 days) to the *A. saturoides* extract. In this study,

male rats exposed to this extract did not exhibit clinical signs of toxicity. The evaluation of these parameters did not demonstrate systemic toxicity. However, the histopathological analysis of target organs (liver and kidney) should be conducted.

Clinical biochemical determinations to investigate toxic effects on target toxicity organs should be performed and under certain circumstances may provide important information. In this study, the enzymes evaluated that can be used as indicative of hepatocellular effects (ALT and AST) and renal dysfunction (creatinine, urea) (Lameire *et al.*, 2005) were not altered by the treatment. However, the subacute exposure to the extract led to an increase in the lymphocytes number in the animals exposed to the highest doses of the extract (500 and 750 mg/kg). Elizondo *et al.* (1994) states that the increase of the lymphocytes proliferation suggests an immunostimulatory effect, however the mechanisms are not clear. These data (biochemical and hematological) reinforce the absence of systemic toxicity after prolonged exposure to this extract.

Several plants commonly used in folk medicine can negatively affect the male reproduction in animals and humans. An antiespermatogenic activity is among the observed adverse effects (D'CRUZ *et al.*, 2010). It is known that the number of spermatids present in the testis and the daily sperm production are important indicators of male fertility potential (FERNANDEZ *et al.*, 2008). In this study, some well-validated sperm parameters in reproductive toxicology were evaluated after subacute exposure to the extract. The male animals presented a decrease in the spermatids number in the testis and the daily sperm production in the animals exposed to the highest doses. The highest dose also led to the delay in the sperm transit time through epididymis. Sperm transit time seems to play an important role in the process of sperm maturation, and changes in this parameter (delay or acceleration) may compromise this process (FERNANDEZ *et al.*, 2008). Studies reported antispasmodic, cholinolytic and

myorelaxant activities of the extract of *A. satureioides* (Simões et al.; 1986; Langeloh and Schenkel, 1987; Teske and Trentini, 2001). These activities could be the cause of the delay in the sperm transit time observed in the present study.

Although the extract was toxic to the male reproductive system, the changes provoked by the extract did not affect the fertility of the treated male or the sexual behavior, since all the animals, when placed with their respective females during the mating period, were able to mate them, and only one female was not pregnant. It is important to emphasize that the reduction in the sperm quantity and quality is not a direct measure of fertility, unless a very drastic effect has been induced (NEUBERT, 1997). It is known that in some species of rats and mice, sperm production can be reduced by 90% without compromising fertility. However, less severe reductions can have drastic consequences for humans who are closer to the threshold for the number of spermatozoa needed to ensure reproductive competence (ZENICK and CLEGG, 1989).

We demonstrated that the ethanolic extract obtained from *A. satureioides* showed significant toxic effects on sperm parameters when administered orally to male rats, without compromising the fertility. Furthermore, the extract altered the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of the dams, and this effect could have a negative repercussion on the development of the pups, which should be evaluated in future studies.

REFERENCES

- Almeida, S.P. de et al. Thick: useful plant species. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.
- Boersma, G.J.; Bale T.L.; Casanello, P., Lara H.E.; Lucion A.B; Suchecki D.; TamashiroK.L. Long term impact of early life events on physiology and behaviour. **Journal of Neuroendocrinology**. Sep;26 (9):587-602, 2014.
- Carini, J.P.; Klamt, F.; Bassani, V.L. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: Promising biomolecules for anticancer therapy. **Research Natural Product**, 4, 3131–3144. 2013.

- Cunha, L.C. Evaluation of acute and subacute toxicity in rats of leaf and latean ethanolic extract of *Synadenium umbellatum* Pax **Revista brasileira de farmacognosia**, v.19, n.2, p.403-411, 2009.
- D’Cruz S.C., Vaithnathan S., Jubendradass R., Mathur, P.P. Effects of plants and plant products on the testis. **Asian Journal of Andrology**, n.12, p.468–479, 2010.
- Da Silva, F.L.; Langelo, A. A comparative study of antispasmodic activity of hydroalcoholic 80% (V/V) extracts of *Achyrocline satureioides* (Larn.) DC (Asteraceae) with papaverine and atropine on rat isolated jejunum. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, 13, p.35–40, 1994.
- De Souza, K.C.B. *et al.* Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine** 14, p.102–108, 2007
- Deble, L.P. O género *Achyrocline* (Less.) DC. (Asteraceae: Gnaphalidae) no Brazil. PhD. Thesis. Universidad Federal de Santa Maria, Brazil. 2007.
- Fernandez, C.D.; Porto, E.M.; Arena, A.C., Kempinas, W.de G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. **International Journal of Andrology**, Aug;31(4):427-37, 2008.
- Filler. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In: Chapin, R.E., Heindel, J.J. **Methods in Toxicology: Male Reproductive Toxicology**. Academic Press, San Diego. 1993.
- Holst, L.; Wright D.; Haavik S.; Nordeng, H. The use and the user of herbal remedies during pregnancy. **Journal of Alternative Complementary Medicine**, 15, p. 787-792, 2009.
- Lameire N; Van Biesen W; Vanholder R. Acute renal failure. **Lancet**, 365: 417-447. 2005.
- Langeloh, A.; Schenkel, E. P. **Antispasmodic activity of marcela alcoholic extract (*Achyrocline satureioides*, DC, Compositae) on the genital smooth muscle of rats.** In: SYMPOSIUM OF MEDICINAL PLANTS OF BRAZIL, 7, 1 a 3 de setembro de 1982, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: ORÉADES, p. 454-458, 1987.
- Lindzon, G.; Sadry, S.; Sharp, J. **Toronto Notes for Medical Students**, 27th ed.; Type & Graphics Inc.: North York, ON, Canada, 2011
- Martey O.N, Armah G., OkineL K.N. Absence of organ specific toxicity in rats treated with Tonica, anaqueous herbal haematinic preparation. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine**, 7: 231-240, 2010.
- Neubert, D.; Chahahoud , I. Possible consequences of pre- or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. **Endocrine Chemical Environment**, v. 3, p. 24-52, 1995.

Paz, A.E. *et al.* Uso Racional de las Plantas Medicinales. **Fin de Siglo**, Montevideo, Uruguay, 1992.

Petenatti, E.M., Nievas, C.M., Petenatti, M.E., Del Vitto, L.A. Medicamentos Herbarios en el Centro-oeste Argentino, IV. “Marcelas” y “Vira-viras” em Muestras Comerciales. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 23 (4), 484–491, 2004.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. Guideline 421, Head of Publications Service, Paris, France, 2015.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Guideline 407, Head of Publications Service, Paris, France, 2008.

Sabini, M.C.; Cariddi, L.N.; Escobar, F.M.; Manas, F.; Comini, L.; Reinoso, E.; Sutil, S.B.; Acosta, A.C.; Montoya, S.N.; Contigiani, M.S.; Zanon, S.M.; Sabini, L.I. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 463-470, 2013.

Salgueiro, A.C.F.; Folmer, V.; DA Silva, M.P.; Mendez, A.S.L; Zemolin, A.P.P.; Posser, T.; Franco, J.L. Puntel, R.L.; Puntel, G.O. Effects of bauhinia forficata tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 9, 2016.

Santin, J. R.; Lemos, M.; Júnior, L. C. K.; Niero, R.; de Andrade, S. F. “Antiulcer effects of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models,” **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 334–339, 2010.

Silva Júnior, A. A. **Essentia herba - bioactive plants**. Florianópolis: Epagril, 2006. v.2

Simões, C.M.O.; Rech, N.; Lapa, A.J. Pharmacological investigation of the aqueous extract of leaves / stems of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae (marcela). **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 2, n.1, p. 37 – 54, 1986.

Retta, D.; Dellacassa, E.; Villamil, J.; Suárez, S.; Bandoni, A.L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Ind. Crops Prod**, 38, 27–38, 2012

Rivera, F. *et al.* Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela). **Journal of Ethnopharmacology**, Montevideú, v. 95, n. 2, p. 359-362, dec. 2004.

Taylor PD, Poston L. Developmental programming of obesity in mammals. **Experimental Physiology**; 92(2): 287-98, 2007

Teske, M.; Trentini, A.M.M. **Herbarium compendium of herbal medicine**. 4. ed. Curitiba: Herbarium Lab. Bot. LTDA, 2002.

Zenick H; Clegg E.D; Perreault S.D; Klinefelter G.R; Gray L.E. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach, in **“Principles and methods of toxicology”**, (W. Hayes, ed.) Raven: New York, 1994.

Wang Y, Rogan WJ, Chen PC, Lien GW, Chen HY, Tseng YC, Longnecker MP, Wang SL. **Environ Health Perspect.** May;122(5):529-34, 2014

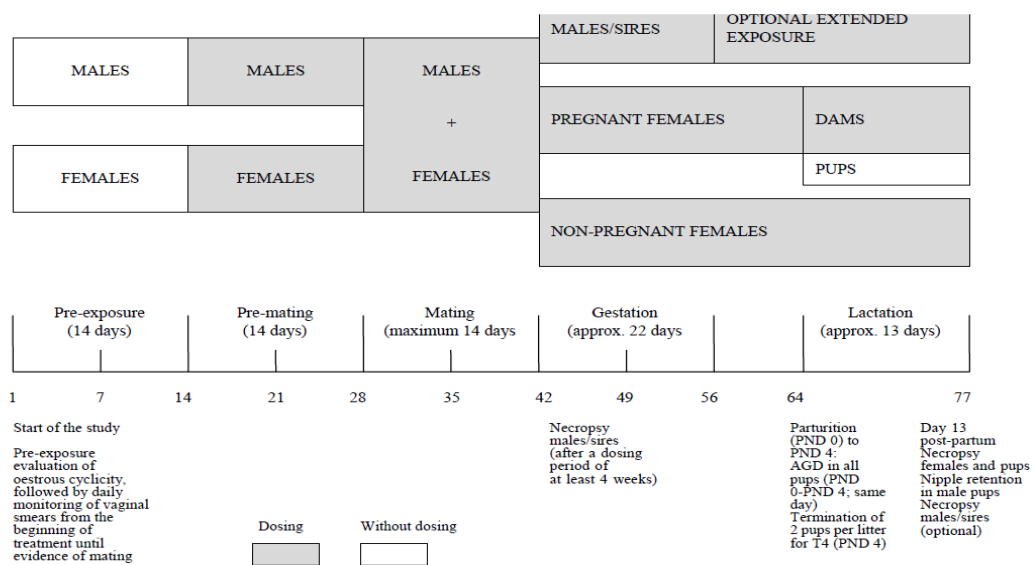


Figure 2. Experimental schedule (OECD, 2015).

Table 1. Phytochemical analysis of *A. saturoioides* extract by HPLC-DAD.

Peak	Retention time (min)	Compounds	mg/g
1	8.64±0.4	Caffeic acid	36.7±0.4
2	17.28±0.5	Ferulic acid	8.1±0.1
3	25.10±0.3	Rutine	18.7±0.2
4	35.33±0.4	Quercetin	346.7±2.3
5	36.68±0.2	Luteolin	100.0±0.9

Table 2. Body weight gain and food and water consumption of parental male and female rats during the treatment with *A. saturoioides* extract.

Parameters	Experimental groups			
	Control	250 mg/kg	500mg/kg	750 mg/kg
<i>Male</i>				
Initial weight (g)	446.00± 48.52	451.87 ± 36.81	455.62 ± 46.84	457.87 ± 48.72
Final weight (g)	458.35± 54.04	469.27 ± 34.43	470.17 ± 53.23	473.70 ± 51.04
Body weight gain (%)	5.10 (1.85 – 8.57)	4.07 (0.810.60)	4.08(1.03 - 6.27)	4.90(0.26 -6.00)
Food intake (g/day)	31.64 ± 1.78	53.08 ± 1.18	52.36 ± 1.12	50.10 ± 0.83
Water intake (mL/day)	51.24± 4.33	49.73 ± 3.56	47.75± 2.97	49.96± 3.77
<i>Female</i>				
Initial weight (g)	259.00 ± 23.76	255.00 ± 24.20	266.62 ± 27.50	264.30 ± 35.32
Final weight (g)	319.00. ± 33.79	305.05 ± 30.85	319.25 ± 22.81	319.77 ± 36.65
Body weight gain (%)	30.11 (48.93-22.55)	23.08 (35.0-14.39)	22.64 (43.33-9.80)	24.49 (29.25-22.58)
Food intake (g/day)	55.34 ± 4.21	63.48 ± 16.54	50.38 ± 9.18	58.47 ± 12.21
Water intake (mL/day)	98.96 ± 12.19	105.45 ± 22.13	87.52 ± 15.86	100.49 ± 14.91

Values expressed as mean ± SEM, n=8 animals/group. P > 0.05 by ANOVA.

Table 3.Relative organ weight (g/100 g of body weight) of parental male and female rats treated with extract of *Achyrocline satureioides*.

Parameters	Experimental groups			
	Control	250 mg/kg	500mg/kg	750 mg/kg
<i>Male</i>				
Body weight (g)	461.87 ± 54.58	472.43 ± 34.22	475.26 ± 40.52	467.63 ± 52.92
Liver (g/100g)	3.03 ± 0.19	2.96 ± 0.20	2.88 ± 0.18	2.90 ± 0.38
Kidney (g/100g)	0.30 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.04
Adrenal gland (mg/100g)	6.12 ± 2.35	5.87 ± 1.35	7.00 ± 1.69	7.75 ± 1.831
Spleen (g/100g)	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.02
Heart (g/100g)	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.04
Lung (g/100g)	0.39 ± 0.2	0.42 ± 0.08	0.39 ± 0.05	0.42 ± 0.10
Testis (g/100g)	0.40 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.06
Vas deferens (g/100g)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Prostate (g/100g)	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.02
Epididymis (g/100g)	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.07	0.13 ± 0.01
Seminal gland (g/100g)	0.29 ± 0.10	0.32 ± 0.07	0.26 ± 0.05	0.29 ± 0.03
<i>Female</i>				
Body weight (g)	307.41 ± 37.53	305.18 ± 36.22	308.28 ± 9.133	310.95 ± 27.03
Liver (g/100g)	4.08 ± 0.58	4.02 ± 0.47	4.55 ± 0.55	4.39 ± 0.29
Kidney (g/100g)	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.31 ± 0.00
Adrenal gland (mg/100g)	0.012 ± 0.00	0.012 ± 0.00	0.014 ± 0.00	0.342 ± 0.06*
Spleen (g/100g)	0.25 ± 0.04	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.27 ± 0.05
Heart (g/100g)	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.35 ± 0.02
Lung (g/100g)	0.55 ± 0.07	0.56 ± 0.10	0.61 ± 0.16	0.54 ± 0.07
Thyroid (g/100g)	0.006 ± 0.00	0.005 ± 0.00	0.005 ± 0.00	0.005 ± 0.00
Ovary (g/100g)	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Uterus (g/100g)	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.06	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.05

Values expressed as mean ± SEM, n=8 animals/group. *p<0.05 (ANOVA, Tukey).

Table 4. Maternal and fetal variables after treatment with *Achyrocline satureioides* extract.

Parameters	Experimental groups			
	Control	250 mg/kg	500mg/kg	750 mg/kg
Gestational period (days)	22.12 ± 0.64	21.62 ± 0.51	22.208 ± 0.44	22.00± 0.00
Number of pups/litter	11.50 ± 0.92	11.87 ± 1.64	10.66 ± 2.06	11.50 ± 1.91
Number of female pups	5.50 ± 0.92	6.12 ± 1.72	6.16 ± 2.92	6.00 ±1.41
Number of male pups	6.00 ± 1.19	5.62 ± 1.92	4.50 ± 1.37	5.50 ± 6.64
Male pup weight at PND 4	12.26 ± 1.66	11.48 ± 1.56	13.49 ± 1.75*	12.67 ± 0.83
Male pup weight at PND 13	31.24 ± 4.72	30.75 ± 1.68	34.59 ± 4.17*	32.90 ± 2.39
Female pup weight at PND 4	11.21 ± 1.34	11.33 ± 1.27	12.54 ± 1.35*	12.32 ± 0.93
Female pup weight at PND 13	30.97 ± 3.04	28.93 ± 2.53	33.05 ± 4.22	32.08 ± 2.00
Male pup relative AGD (mm/g) at PND 4	2.60 ± 0.35	2.47 ± 0.34	2.54 ± 0.23	2.50 ± 0.20
Female pup relative AGD (mm/g) at PND 4	1.49 ± 0.24	1.53 ± 0.28	1.39 ± 0.22	1.39 ± 0.19

Values expressed as mean ± SEM, n=8 animals/group. *p<0.05 (ANOVA, Tukey)

Table 5. Thyroid hormonal levels of pups from treated-dams with *Achyrocline satureioides* extract.

Parameters	Experimental groups			
	Control	250 mg/kg	500 mg/kg	750 mg/kg
TSH males (PND 4)	0.017 ± 0.015	0.022 ± 0.017	0.012 ± 0.003	0.016 ± 0.008
T4 males (PND 4)	5.24 ± 1.44	5.47 ± 0.422	4.66 ± 1.143	4.80 ± 1.347
TSH females (PND 4)	0.027 ± 0.018	0.022 ± 0.011	0.021 ± 0.016	0.026 ± 0.016
T4 females (PND 4)	5.95 ± 1.21	4.48 ± 0.52	4.97 ± 1.62	4.89 ± 1.24
TSH males (PND 13)	0.018 ± 0.014	0.022 ± 0.016	0.009 ± 0.003	0.026 ± 0.014
T4 males (PND 13)	11.63 ± 0.739	11.79 ± 0.643	11.29 ± 1.103	11.54 ± 0.917
TSH females (PND 13)	0.011 ± 0.007	0.016 ± 0.011	0.010 ± 0.006	0.010 ± 0.005
T4 females (PND 134)	11.48 ± 0.820	11.00 ± 1.702	10.87 ± 0.728	11.48 ± 0.350

Values expressed as mean ± SEM, n=8 animals/group. P > 0.05 by ANOVA.

Table 6. Biochemical parameters and thyroid hormonal levels of parental females after treatment with *Achyrocline satureioides* extract.

Parameters	Experimental groups			
	Control	250 mg/kg	500mg/kg	750 mg/kg
Alanine aminotransferase (U/L)	87.33± 50.09	120.57 ± 47,81	116.00 ± 61.51	96.50 ± 9.19
Aspartate aminotransferase (U/L)	261.00 ± 85.74	325.12 ± 59.62	277.62 ± 51.71	201.00 ± 1.41
Calcium (mg/dL)	13.56 ± 8.76	8.97 ± 3.82	29.27 ± 11.77*	12.87 ± 7.58
Creatinine (mg/dL)	0.80 ± 0.57	1.51 ± 0.72	1.03 ± 0.62	1.48 ± 0.87
Alkaline phosphatase (U/L)	71.62 ± 37.41	117.87 ± 135.35	143.37± 113.64	105.89 ± 87.69
Total protein (g/dL)	4.80 ± 3.94	4.20 ± 2.46	5.57 ± 2.11	4.89 ± 2.74
Urea (mg/dL)	54.12 ± 32.40	50.75 ± 21.20	51.12 ± 25.02	52.87 ± 28.62
TSH (uUI/dL)	0.005 ± 0.00	0.028 ± 0.03	0.036 ± 0.01*	0.010 ± 0.01
T4 (ug/dL)	10.93 ± 1.03	10.46 ± 0.70	9.63 ± 1.53	8.52 ± 2.89

Values expressed as mean ± SEM, n=8 animals/group. *p<0.05 (ANOVA, Tukey).

Table 7. Biochemical and hematological parameters levels of parental males after treatment with extract of *Achyrocline satureioides*.

Parameters	Experimental groups			
	Control	250 mg/kg	500mg/kg	750 mg/kg
Alanine aminotransferase (U/L)	115.14 ± 47.38	108.75 ± 40.55	129 ± 34.57	109.85 ± 33.71
Aspartate aminotransferase (U/L)	343.75 ± 73.49	325.00 ± 17.95	308.57 ± 100.15	304.75 ± 38.18
Calcium (mg/dL)	6.52 ± 2.30	8.35 ± 2.88	9.5 ± 4.71	9.1 ± 2.92
Creatinine (mg/dL)	4.42 ± 0.54	3.65 ± 1.40	4.33 ± 1.17	4.08 ± 1.11
Alkaline phosphatase (U/L)	255.80 ± 116.10	394.40 ± 81.24	224.33 ± 135.69	309.66 ± 202.36
Total protein (g/dL)	8.4 ± 0.70	7.2 ± 2.56	7.55 ± 3.70	12.00 ± 3.79
Urea (mg/dL)	32.62 ± 7.68	35.71 ± 5.09	41.00 ± 10.58	37.87 ± 11.54
Albumin (g/dL)	3.62 ± 1.18	4.1 ± 0.43	3.34 ± 1.06	3.87 ± 1.84
Erythrocytes (g/dL)	7.04 ± 1.43	7.18 ± 0.72	6.94 ± 1.70	6.14 ± 1.92
Hematocrit (%)	44.62 ± 4.65	45.25 ± 7.20	43.62 ± 4.65	46.12 ± 4.82
Leukocytes (10 ³ /μL)	9.33 ± 2.41	8.28 ± 2.39	7.59 ± 2.92	8.94 ± 3.59
Lymphocytes (%)	54.25 ± 12.71	61.12 ± 11.91	69.37 ± 8.76*	71.5 ± 9.08*
Neutrophils (%)	43.25 ± 13.83	37.37 ± 11.43	30.87 ± 7.73	29.50 ± 9.25
Eosinophils (%)	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Monocytes (%)	2.50 ± 1.77	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00
Platelets (10 ³ /μL)	87.37 ± 40.14	71.12 ± 47.55	70.87 ± 24.43	86.37 ± 65.23

Values expressed as mean ± SEM, n=8 animals/group. *p<0.05 (ANOVA, Tukey).

Table 8. Sperm parameters and plasma testosterone levels of parental male rats treated with *Achyrocline satureioides* extract.

Parameters	Experimental groups			
	Control	250 mg/kg	500mg/kg	750 mg/kg
Absolute spermatids number in the testis(x10 ⁶ /testis)	164.91 ± 34.61	141.32 ± 58.80	93.23 ± 45.35*	99.80 ± 12.58*
Relative spermatids number in the testis(x10 ⁶ /g/testis)	81.13 ± 16.29	76.44 ± 31.13	57.38 ± 13.27	64.46 ± 21.19
Daily sperm production (x10 ⁶ /testis/day)	27.03 ± 5.67	23.16 ± 8.65	15.77 ± 7.43*	16.36 ± 2.06*
Relative sperm count in the caput/corpus epididymis (x10 ⁶ /g)	271.87 ± 71.33	261.09 ± 46.91	264.82 ± 78.14	310.46 ± 42.88
Relative sperm count in the cauda epididymis (x10 ⁶ /g)	460.95 ± 216.84	379.33 ± 147.38	434.28 ± 185.50	484.37 ± 111.08
Sperm transit time in the caput/corpus (days)	3.66 ± 0.84	4.43 ± 0.90	5.50 ± 2.21	6.46 ± 0.85
Sperm transit time in the cauda (days)	4.39 ± 1.99	5.28 ± 1.98	7.09 ± 3.53	8.10 ± 1.96*
Normal morphology sperm (%)	100 (99.00-100)	100 (99.50-100)	100 (99.00-100)	100 (99.00-100)
Testosterone levels (ng/mL)	1.86 ± 2.60	2.09 ± 1.22	0.99 ± 0.85	1.72 ± 1.40

Values expressed as mean ± SEM, n=8 animals/group. *p<0.05 (ANOVA, Tukey). % Values expressed as median interquartile (Q1-Q3). Kruskal-Wallis com followed for Dunn.

6 ANEXOS

PARECER DE APROVAÇÃO DO CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da Toxidade reprodutiva e do desenvolvimento de ratos expostos ao Extrato Etanólico de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC", Protocolo nº 1026-CEUA, sob a responsabilidade de **Arielle Cristina Arena**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 04/09/2017	Término: 13/11/2017
Espécie/linhagem:	Rato/ Wistar	
Nº de animais:	80	
Peso:	200-300g	Idade: 90 dias
Sexo:	Masculino	
Origem	Biotério Central da Unesp – Câmpus de Botucatu/SP.	

Botucatu, 10 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Presidente da CEUA



Instituto de Biociências – Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: seccta@ibb.unesp.br