



Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO
LIOFILIZADO DE CHAPÉU-DE-COURO (*Echinodorus grandiflorus*)
EM RATAS PRENHES**

**JUIZ DE FORA
2010**

SÔNIA SIN SINGER BRUGIOLO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO
LIOFILIZADO DE CHAPÉU-DE-COURO (*Echinodorus grandiflorus*)
EM RATAS PRENHES**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de concentração Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Saúde.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Martha de Oliveira Guerra

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Vera Maria Peters

JUIZ DE FORA

2010

SÔNIA SIN SINGER BRUGIOLO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO
LIOFILIZADO DE CHAPÉU-DE-COURO (*Echinodorus grandiflorus*)
EM RATAS PRENHES**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de concentração Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Saúde.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Martha de Oliveira Guerra - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Vera Maria Peters – Co-orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a Dr^a Tânia Toledo de Oliveira
Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Juscélio Clemente de Abreu
Universidade Vale do Rio Verde

Prof^a. Dr^a. Maria Christina Marques Nogueira Castanon
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. João Evangelista de Paula Reis
Universidade Federal de Juiz de Fora

JUIZ DE FORA
2010

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra Vera Maria Peters, por quem tenho grande admiração, pelas sugestões e pela contribuição na realização deste trabalho.

À Professora Dra Martha de Oliveira Guerra, pela orientação, pela paciência, pelo carinho e pela confiança depositada em mim. Obrigada pelo exemplo de dedicação, seriedade e paixão pela pesquisa na área de Reprodução que a senhora faz crescer dentro de todos nós.

Ao Professor Daniel Sales Pimenta, pela sugestão de trabalhar com chapéu-de-couro e por todos os ensinamentos que me passou, despertando em mim a vontade de continuar pesquisando este fitoterápico.

À professora Dra Tânia Toledo de Oliveira, pelo empréstimo de material e pelas valiosas sugestões sempre construtivas, pelas vezes que me recebeu com imensa boa vontade para me explicar os mecanismos de ação de diversos princípios ativos, tornando fácil a sua compreensão.

À Professora Beatriz Julião Vieira Aarestrup, pelas análises histopatológicas.

Ao Prof. Roberto Sotto Maior Fortes pela leitura e correção do manuscrito.

À Professora Elita Scio Fontes e ao Professor Rodrigo Luiz Fabri, do Departamento de Bioquímica da UFJF, pela caracterização química do extrato aquoso liofilizado de chapéu-de-couro.

Ao professor Luiz Cláudio Ribeiro, do Departamento de Matemática e Estatística da UFJF, pela valiosa ajuda nas análises estatísticas.

À técnica Marlice de Freitas, funcionária da EMBRAPA-CNPGL-JF, pela liofilização do extrato.

À Vânia Pinheiro de Sousa, do CDC/Biblioteca Universitária da UFJF, pelas correções das citações.

Aos funcionários, estagiários e bolsistas do Centro de Biologia da Reprodução, em especial à Dayana Mendes Ribeiro, pela amizade, carinho e cooperação. Isso proporcionou um ambiente agradável, facilitando a execução deste trabalho.

À Rede Mineira de Bioterismo e Rede Mineira de Toxicologia e Farmacologia de Produtos Terapêuticos – FAPEMIG, pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas do Departamento de Zoologia que sempre me incentivaram. Obrigada pela presença, pelo companheirismo, pelas sugestões, pelas correções, pela força.

À Sílvia, irmã, amiga, companheira desde sempre... não tenho palavras...

Aos meus filhos Alessa, Inessa e Alexandre por compartilharem os meus sonhos.

Ao José Geraldo pela imensa paciência, pela ajuda silenciosa e pela alegria com que recebeu todas as minhas vitórias.

A Deus.

RESUMO

No Brasil, existem inúmeras espécies de plantas que são utilizadas como fitoterápicos, e, dentre elas, encontra-se *E. grandiflorus*, uma Alismatacea herbácea, aquática ou semi-aquática, conhecida popularmente como chapéu-de-couro, muito utilizada na medicina popular como diurética e anti-inflamatória e no tratamento de doenças renais, reumatismo, afecções cutâneas e problemas do fígado. Diversos trabalhos confirmaram suas ações farmacológicas como diurética, anti-inflamatória e antinociceptiva, hipotensora, anti-hipertensiva e vasodilatadora, antimicrobiana, tripanocida *in vitro*, leishmanicida, antineoplásica, hipocolesterolêmica e imunossupressora, entretanto sua toxicidade ainda não foi avaliada na gestação. Inúmeros agentes podem interferir com a funcionalidade do sistema reprodutor feminino e com uma ou mais fases do desenvolvimento embrionário, mas os fármacos e os fitofármacos, pela frequência com que são utilizados durante o período gestacional estão na lista dos fatores mais preocupantes. Considerando que o chapéu-de-couro é componente de refrigerante de grande aceitação popular e a grande utilização do chá pela população dado ao seu potencial terapêutico, e considerando a inexistência de estudos sobre a toxicidade da planta no período gestacional torna-se necessário avaliar sua toxicidade e, no presente trabalho, pretendeu-se avaliar tal efeito em fêmeas de ratas Wistar. Durante 15 dias foram feitos esfregaços vaginais para observação da regularidade do ciclo estral. Ratas com ciclo estral regular foram distribuídas em quatro grupos experimentais (n=16): C, grupo controle, que recebeu solução salina por gavagem, durante 15 dias, e T-250, T-500 e T-1000, grupos tratados, que receberam o extrato nas doses de 250, 500 e 1000mg/kg/dia, respectivamente, período no qual também foi feito esfregaço vaginal. As ratas foram acasaladas e as gestantes foram tratadas até o 14^o dia. No 15^o dia foram eutanasiadas por exsanguinação total sob anestesia e laparotomizadas para exame, remoção e pesagem dos órgãos e registro das variáveis maternas, ninhadas e placentas. O sangue colhido serviu para realização de hemograma e determinação das concentrações plasmáticas de uréia, creatinina, colesterol, triglicérides, alanina transaminase e aspartato transaminase. Fígado, rins, baço, ovários e adrenais foram removidos e pesados, sendo processados para análise histopatológica fígado, rim e baço. O número de corpos lúteos, implantes, reabsorções, fetos vivos e mortos foi contado. Não foram observados sinais detectáveis de toxicidade materna, aferidos por piloereção, diarréia, alteração na deambulação no interior da gaiola e mortes. Observou-se redução da proporção de fases estrais depois do tratamento no grupo T-1000. Em todos os grupos tratados a média de corpos lúteos, implantes e reabsorções por mãe foi semelhante, assim como o índice de perda pós-implantação, proporção de implantação e reabsorção. Foram registrados anemia e aumento na concentração de aspartato transaminase nos três grupos tratados, aumento de colesterol e leucocitose na maior dose, e alterações histopatológicas no fígado nas três doses testadas, no rim, nas doses de 500 e 1000mg/kg/dia e no baço de animais tratados com 1000mg/kg/dia. Analisados em conjunto, os dados do presente trabalho são indicativos de que o extrato aquoso liofilizado de *E. grandiflorus* administrado a ratas prenhes nas doses de 250, 500 e 1000mg/kg/dia e nas condições deste experimento foi tóxico para as mães, mas não alterou a performance reprodutiva e nenhuma malformação externa foi observada nos fetos.

Palavras-chave: toxicidade, reprodução, ratas, prenhez, *Echinodorus*, *Echinodorus grandiflorus*, chapéu-de-couro.

ABSTRACT

In Brazil, there are countless species that are used as phytotherapies, and among them there is *E. grandiflorus*, an Alismatacea aquatic or semi-aquatic herb, popularly known as chapéu-de-couro, commonly used in folk medicine as diuretic and anti-inflammatory and also in the treatment of kidney diseases, rheumatism, skin conditions and liver disorders. Several studies have confirmed its diuretic, anti-inflammatory and antinociceptive, hypotensive, antihypertensive and vasodilatory, antimicrobial, in vitro trypanocidal, leishmanicidal, antineoplastic, immunosuppressive and hypocholesterolemic pharmacological properties, though its toxicity was not evaluated during pregnancy. Numerous agents can interfere with the female reproductive system functionality and with one or more stages of embryo development, but the drugs, due to the frequency that they are used, are on the list of the most concerning factors. Considering the therapeutic potential of *E. grandiflorus* and the widespread utilization of its tea with curative purposes by the population and the lack of studies about this herb toxicity during pregnancy, its necessary to evaluate its toxicity and the aim of this study was to evaluate this effect on Wistar rats. During 15 days, vaginal smears were performed to observe the regularity of the estrous cycle. Rats with regular estrous cycle were separated into four experimental groups (n=16): C, control group that received saline solution by gavage, during 15 days, and T-250, T-500 and T-1000 which were treatment groups that received doses of 250, 500 and 1000 mg/kg/day of the extract, respectively, during this same period the vaginal smear was also performed. The rats were mated and the pregnant ones were treated up to the 14th day. On the 15th day they were euthanized by the method of exsanguination under full anesthesia and, then, laparotomized for examination, the organs were removed and weighed and the maternal, litter and placenta variables were recorded. Blood tests were made and the plasmatic concentrations of urea, creatinine, cholesterol, triglycerides, alanine transaminase and aspartate transaminase were determined. The liver, kidneys, spleen, ovaries and adrenal glands were removed and weighed. The number of corpora lutea, implants, resorptions, and live and dead fetuses were counted. The liver, the spleen, and the kidneys of pregnant rats were processed for histopathological analysis. There were no detectable signs of maternal toxicity, as measured by piloerection, diarrhea, change in ambulation in the cage and death. A reduction in the proportion of the estrous phases was observed after the treatment in the T-1000 group. In all treatment groups the average number of corpora lutea, implantations and reabsorption per dam was similar, as well as the post-implantation loss rate, the proportion of implantation and reabsorption. There were records of anemia and increased aspartate transaminase in all three treatment groups, in the highest dosage it was registered increase of cholesterol and leukocytosis, and histopathological alterations in the kidneys, liver and spleen of the dams. Taken together, this study data indicate that the administration of lyophilized aqueous extract of *E. grandiflorus* to pregnant rats at the dosages of 250, 500 and 1000 mg/kg/day, under this experiment conditions, was toxic to the dams, but did not affect the reproductive performance and no external malformation was observed in the fetuses.

Keywords: toxicity, reproduction, rats, pregnancy, *Echinodorus*, *Echinodorus grandiflorus*, chapéu-de-couro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>E. grandiflorus</i> : aspecto da inflorescência com flores em antese. Foto: PIMENTA, D. S. (2000)	19
Figura 2	<i>E. grandiflorus</i> : aspecto das folhas. Foto: PIMENTA, D. S. (2000)	19

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Constituintes químicos isolados em <i>E. grandiflorus</i>	23
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AICI3	Cloreto de alumínio
ALT/TGP	Alanina transaminase/Transaminase glutâmico-pirúvica
AST/TGO	Aspartato transaminase/Transaminase glutâmico-oxalacética
CG/EM	Cromatografia de gases/Espectrometria de massa
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Especificidade
Fl	fentolitro
FeCl3	Percloroeto de ferro
g	grama
g/dl	grama/decilitro
HGM	Hemoglobina Globular Média
IgE	Imunoglobulina E
IL-4	Isoleucina 4
IL-11	Isoleucina 11
Kg	quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
MCI	Micicço celular interno
M	molar
mg	miligrama
ml	mililitro
mm ³	milímetros cúbicos
µl	microlitro
NAOH	Hidróxido de sódio
nm	manômetro
OVA	Ovalbumina
pg	picograma
U/L	unidades/litro
UV	ultravioleta
VGM	Volume Globular Médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Hipótese	15
1.2 Objetivos	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Plantas medicinais	16
2.2 <i>Echinodorus grandiflorus</i>	18
2.2.1 Características botânicas	19
2.2.2 Constituintes químicos	21
2.2.3 Etnofarmacologia	23
2.2.4 Farmacologia experimental	24
2.2.4.1 Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva	24
2.2.4.2 Atividade diurética	25
2.2.4.3 Atividades hipotensora, anti-hipertensiva e vasodilatadora	25
2.2.4.4 Atividade antimicrobiana	26
2.2.4.5 Atividade tripanocida <i>in vitro</i>	27
2.2.4.6 Atividade leishmanicida	27
2.2.4.7 Atividade antineoplásica	27
2.2.4.8 Atividade hipocolesterolêmica	28
2.2.4.9 Atividade imunossupressora	28
2.2.4.10 Atividade larvicida para <i>Aedes aegypti</i>	28
2.3 Fisiologia do sistema reprodutor feminino	29
2.3.1 Fisiologia dos ovários	29
2.3.2 Fisiologia dos condutos femininos	31
2.4 Desenvolvimento embrionário precoce	32
2.4.1 Segmentação e transporte do embrião	33
2.4.2 Aspectos fisiológicos e bioquímicos relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial	34
2.4.3 Trânsito do embrião pela tuba uterina e útero	35
2.4.4 A implantação do blastocisto	36
2.4.5 As fases da implantação	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Procedência da planta	42
3.2 Animais de experimentação	42
3.3 Condições de criação e alojamento dos animais	42
3.4 Obtenção do extrato aquoso liofilizado de <i>E. grandiflorus</i> (EAEg)	43
3.5 Avaliação qualitativa do extrato aquoso liofilizado de <i>E. grandiflorus</i> (EAEg)	43
3.5.1 Alcalóides	43
3.5.2 Triterpenos e Esteróides	44
3.5.3 Saponinas	44
3.5.4 Cumarinas	44
3.5.5 Compostos fenólicos	45
3.5.6 Taninos	45
3.5.7 Antraquinonas	45
3.5.8 Flavonóides	45
3.6 Doses e via	46
3.7 Organização dos grupos e tratamento	46
3.8 Parâmetros sanguíneos	47
3.9 Estudo histopatológico	48

3.10 Análise dos dados	49
3.11 Aprovação do protocolo pela Comissão de Ética na Experimentação Animal	49
4 RESULTADOS	50
4.1 ETHNOBOTANY AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY OF <i>ECHINODORUS GRANDIFLORUS</i> (CHAPÉU-DE-COURO)	50
4.2 REPRODUCTIVE TOXICITY OF <i>ECHINODORUS GRANDIFLORUS</i> IN PREGNANT RATS	52
5 COMENTÁRIOS	56
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICE A	71
APÊNDICE B	84
ANEXO A	85
ANEXO B	86

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Echinodorus grandiflorus*, conhecida como chapéu-de-couro, é uma planta medicinal muito utilizada pela população como diurética, anti-inflamatória e anti-reumática, porém, pobremente estudada quanto a sua toxicidade. Na literatura foram encontrados apenas os trabalhos de Polacchine (2005), que avaliou a toxicidade aguda do extrato aquoso da planta utilizando até 4g/kg, e de Silva *et al.* (2010), que avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade do extrato aquoso de *E. grandiflorus*. Entretanto, nenhuma pesquisa foi encontrada, até o momento, avaliando a toxicidade de *E. grandiflorus* na reprodução.

A reprodução é um conjunto complexo de processos que ocorre durante a vida dos animais, iniciando-se com a instalação da puberdade e, no caso das fêmeas, seguindo com o desenvolvimento de variações cíclicas e alterações hormonais coordenadas que resultam no desencadeamento do comportamento sexual e culminam no processo de ovulação, possibilitando a concepção, seguindo-se a prenhez, parto e lactação (DONÁDIO, 2005).

Inúmeros agentes podem afetar o funcionamento adequado do sistema reprodutor feminino e o desenvolvimento embrionário em qualquer de suas etapas, mas os fármacos, pela frequência com que são utilizados no período gestacional (SHEPARD, 1980) e pelo fato de que a maioria das drogas pode atravessar a placenta e entrar em contato com o feto (KRAVER; KRAVER; HYTTEN, 1980 **apud** MENDONÇA; MOTTA, 1988), estão na lista dos fatores mais preocupantes.

Fármacos e fitofármacos podem alterar a síntese de hormônios, a gametogênese e/ou inibir os processos de fertilização, clivagem, trânsito tubário e implantação do blastocisto, alterando a fisiologia reprodutiva (HOOD, 2006). Em fêmeas prenhes os extratos de plantas podem alterar o desenvolvimento embrio-fetal (CALLIARI-MARTIN, 2001).

Em se tratando do chapéu-de-couro, pelo menos três das atividades farmacológicas já comprovadas para os diferentes tipos de extrato, poderiam alterar a reprodução: [1] atividade antiinflamatória (CARDOSO *et al.*, 2003), que poderia interferir com a ovulação que é um processo semelhante à inflamação (ESPEY, 1980); [2] atividade hipocolesterolemizante (CARDOSO *et al.*, 2005) que poderia reduzir os níveis de colesterol, substrato para a síntese de progesterona e estrogênio, hormônios essenciais para o endométrio tornar-se receptivo ao blastocisto (HUET; ANDREWS; DEY, 1989; STROWITZKI *et al.*, 2006) e para aumentar a permeabilidade vascular do endométrio permitindo a nidação do embrião (HALDER *et al.* 2000; YOUNG *et al.*, 2010), além de poder alterar o ciclo estral do animal; [3] atividade imunossupressora (PINTO *et al.*, 2007) que poderia perturbar o processo imunossupressor endógeno materno, uma vez que a gestação é um processo que implica na supressão da reação imunológica materna ao feto, que se comporta como um enxerto heterólogo, cujo mecanismo ainda não está bem estabelecido (BARINI *et al.*, 1998; VEENSTRA; HEINEMAN; FAAS, 2000; ALVES *et al.*, 2007).

Considerando a ampla utilização do chapéu-de-couro pela população, as possíveis interações com o processo reprodutivo como descrito acima, os poucos estudos toxicológicos realizados e a inexistência de trabalhos na literatura referentes à toxicidade reprodutiva, no presente trabalho, pretendeu-se avaliar tal efeito do extrato aquoso de *E. grandiflorus* em fêmeas de ratas Wistar.

1.1 Hipótese

A exposição de ratas ao extrato aquoso liofilizado de chapéu-de-couro (*E. grandiflorus*) altera a capacidade reprodutiva de fêmeas adultas e o desenvolvimento embrionário precoce.

1.2 Objetivos

Verificar em ratas tratadas com concentrações crescentes do extrato aquoso liofilizado de chapéu-de-couro (*E. grandiflorus*):

1. A capacidade reprodutiva de fêmeas;
2. O desenvolvimento embrionário precoce.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

As obras mais antigas sobre medicina e plantas medicinais são originárias da China e do Egito (ASSAD, 2005), sendo seu uso no tratamento de doenças conhecido desde a mais remota antiguidade. Diversos povos utilizaram plantas medicinais como única fonte de recursos para a elaboração de medicamentos (DUARTE, 2005).

Até o início do século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos por plantas e/ou extratos vegetais e esses recursos não diferiam muito dos remédios utilizados hoje em dia na medicina popular (SCHENKEL *et al.*, 2002).

Em meados do século XX, a descoberta e o desenvolvimento de processos de síntese de compostos orgânicos, culminaram no desenvolvimento de diversos medicamentos, porém, os efeitos colaterais causados por eles, somados aos altos preços atribuídos aos medicamentos sintéticos promoveram a busca por novas drogas e o interesse por compostos fitoterápicos como alternativa de tratamento (BARROS, 2007).

A busca da cura de doenças pelo uso de ervas, folhas e raízes, provavelmente foi uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais. Com isso, os efeitos das plantas em relação a determinadas enfermidades foram observadas várias vezes, levando à aquisição de conhecimentos empíricos passados de geração a geração (RATES, 2001) originados de diferentes culturas.

As plantas medicinais possuem substâncias ativas de dois tipos: os produtos do metabolismo primário, que são essencialmente sacarídeos utilizados para manutenção da planta, e os produtos do metabolismo secundário, resultantes da assimilação do azoto (nitrogênio amínico), que são os óleos essenciais, resinas, alcalóides, taninos, saponinas,

glicosídeos cardiotônicos, flavonóides, entre outros. Geralmente, estas substâncias não se encontram na planta em estado puro, mas sob a forma de complexos, cujos diferentes componentes se completam e reforçam suas ações sobre o organismo. São estes compostos secundários que têm ampla utilização na fitoterapia. Pode-se citar como exemplo o ópio, látex seco das cápsulas da papoula (*Papaver somniferum*), contendo, entre muitas substâncias, um grande número de alcalóides importantes. Cada alcalóide isolado tem uma ação totalmente diferente do ópio no seu conjunto e provoca no organismo humano efeitos específicos (BOTSARIS,1995).

Os óleos essenciais, por exemplo, são misturas constituídas por um número variado de substâncias orgânicas com estruturas relativamente simples, onde os principais componentes provem de rotas secundárias, no caso monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (PIMENTA, 2002).

Os extratos de plantas medicinais além de serem fontes para a síntese de novos fármacos eficazes e de baixo custo, possuem a vantagem de reunir vários compostos ou uma mistura complexa de diferentes metabólitos, o que resulta na interação destes, tendo como efeito a regulação de um composto pelo outro, com a menor ocorrência de efeitos colaterais sendo a principal vantagem dessa ação combinada (YUNES; CALIXTO, 2001).

No Brasil, cerca de 40% dos produtos farmacêuticos produzidos têm princípios ativos retirados de plantas e sua utilização provém principalmente da cultura africana, européia e indígena brasileira (SIMÕES *et al.*, 1998).

O uso destas plantas para fins curativos está se tornando cada vez mais popular e tem crescido expressivamente nos últimos anos. Isto se deve à busca por terapias naturais, como a fitoterapia, e ao aumento do número de pessoas que não tem acesso aos medicamentos sintéticos modernos, cada vez mais caros (BARROS, 2007).

Tais plantas são tidas como livres de efeitos colaterais, trazendo grandes benefícios. O uso destas ocorre principalmente sob a justificativa de que o que é natural não faz mal à saúde, sendo utilizadas inclusive durante a gestação, fazendo com que gestantes e lactantes constituam um grupo populacional que culturalmente recorre ao uso de plantas medicinais (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 2002). No entanto, o risco do uso destas plantas é elevado, uma vez que os efeitos da maioria delas são desprovidos de qualquer fundamentação científica (AUTOMEDICAÇÃO, 2001), tendo seu uso como medicamento baseado apenas em informações populares.

Segundo Calixto (2000), o aumento do emprego de produtos naturais pela população em todo o território nacional traz consigo o uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico.

Algumas espécies medicinais tornaram-se especialmente importantes nos últimos anos, principalmente devido as suas virtudes terapêuticas e como fonte de renda na sua exploração. Relatórios atestam que chapéu-de-couro (*Echinodorus macrophyllus*), fáfia (*Pfaffia paniculata*) e ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla*) foram as que apresentaram os maiores volumes de material exportado em 2000, alcançando valores expressivos. Assim, a produção destas plantas ou outras, com elevado potencial farmacêutico, pode tornar-se uma importante alternativa de receita para os produtores rurais (BEVILAQUA, 2007).

2.2 *Echinodorus grandiflorus*

E. grandiflorus está incluído na família Alismataceae, ordem Alismatales, no clado Lillianeae (APG III). A espécie *E. grandiflorus*, objeto do presente estudo, pode ser visualizada nas Figuras 1 e 2.



Figura 1. *E. grandiflorus*: aspectos da inflorescência com flores em antese. Foto: Pimenta, D. S. (2002). Com autorização do autor.



Figura 2. *E. grandiflorus*: aspecto das folhas. Foto: Pimenta, D. S. (2002). Com autorização do autor.

2.2.1 Características botânicas

E. grandiflorus (Cham. & Schlechtl.) Micheli é uma planta herbácea, rizomatosa, aquática ou semi-aquática, com folhas submersas, flutuantes ou emergentes e inflorescências que permanecem floridas por aproximadamente 30 dias, produzindo cerca de 220 flores,

sobressaindo acima das folhas durante toda a primavera e verão. As flores são inodoras, actinomorfas, rasas e possuem corola branca com numerosos estames e pistilos amarelos expostos. A antese das flores ocorre pela manhã e cada flor dura cerca de oito horas. Outra característica da espécie é a produção de látex (LEHTONEN, 2008).

Esta planta pertence à família Alismataceae, que consiste de 11 gêneros e de, aproximadamente, 75 espécies, ocorrendo no Brasil os gêneros *Echinodorus* e *Sagittaria* (TANAKA, 2000; PIMENTA 2002).

Segundo Lehtonen (2008), o gênero *Echinodorus* ocorre dos Estados Unidos até a Argentina, sendo restrito ao hemisfério ocidental, predominando na região tropical da América do Sul, sendo esta relatada como centro de diversificação do gênero. Haynes e Holm-Nielsen (1994) registraram seis espécies na região sul do Brasil e, mais recentemente, Bevilaqua *et al.* (2001) concluíram que a espécie predominante no Rio Grande do Sul é *E. grandiflorus*. Matias (2007), estudando macrófitas da região nordeste, citou a ocorrência de doze táxons. Rocha *et al.* (2007), em inventário das macrófitas de ambientes aquáticos do Pantanal (MS), concluíram que *Echinodorus* é um dos gêneros mais representativos, com quatro espécies.

A Taxonomia do gênero *Echinodorus* foi revisada por Lehtonen (2008) e duas novas espécies, *Echinodorus reptilis* e *Echinodorus emersus*, foram descritas, totalizando 28 espécies.

Em toda literatura consultada a designação popular “chapéu-de-couro” se refere tanto à espécie *E. grandiflorus* quanto à *E. macrophyllus*, as quais apresentam praticamente os mesmos constituintes químicos e são utilizadas para os mesmos fins medicinais (PIMENTA, 2002; PIMENTA, 2005). Outros nomes populares utilizados para ambas são chá-mineiro, erva-de-pântano, erva-de-bugre, congonha-do-brejo, erva-do-brejo e chá-de-campanha (CORRÊA, 1984; CORRÊA JÚNIOR *et al.*, 1994; MARTINS *et al.*, 1994; LEITE, 1995).

2.2.2 Constituintes químicos

As plantas, em geral, possuem uma gama variada e rica de princípios ativos. A concentração de princípios ativos na planta depende, naturalmente, do controle genético e dos estímulos proporcionados pelo meio, como, por exemplo, fatores climáticos, edáficos, exposições a microrganismos, insetos, outros herbívoros e poluentes. Algumas podem possuir 30 ou até 100 substâncias farmacologicamente ativas na sua constituição, sendo uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (BOTSARIS,1995; SIMÕES *et al.*, 2004).

Em se tratando de chapéu-de-couro, estudos mais amplos de sua caracterização farmacognóstica evidenciaram grupos químicos de relevância terapêutica. Alcalóides, glicosídeos, saponinas, taninos, flavonóides, terpenos, triterpenos, glicosídeos cardiônicos, resinas, iodo e sais minerais são citados como componentes químicos de *E. grandiflorus* (LORENZI; MATOS, 2002). As substâncias isoladas de *E. grandiflorus* são, principalmente, diterpenos dos tipos clerodano, cembrano e labdano, além de alcalóides diterpenóicos, flavonóides e outros derivados aromáticos (PIMENTA, 2002). Manns e Hartmann (1993) trabalharam com o extrato etanólico das folhas de *E. grandiflorus* e isolaram o diterpeno echinodol e Costa *et al.* (1999) isolaram os ácidos echinóico e hardwickico utilizando o extrato metanólico. Como a designação popular se refere a duas espécies, *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus*, Leite *et al.* (1998), analisaram a composição química de extratos aquosos brutos de ambas, através de estudos cromatográficos, verificando a ausência de alcalóides e a presença de cardenólídeos, cumarinas, flavonóides e a ocorrência abundante de terpenóides nos extratos das duas espécies. Buscando diferenciar quimicamente *E. grandiflorus* de *E. macrophyllus* Tanaka (2000) observou que os clerodanos e cembranos são produtos

característicos de *E. grandiflorus*, baseado em análise de CG/EM dos extratos metanólicos brutos derivatizados com bis-trimetilsililtrifluoroacetamida quando comparado a *E. macrophyllus*. Além disso, Leite *et al.* (2007) acrescentaram características morfológicas para *E. macrophyllus*, como a presença de pelos tectores e de células diafragmáticas, que até então não tinham sido relatados pelas Farmacopéias Brasileiras (1926 e 1959).

Um resumo dos principais constituintes químicos isolados de *E. grandiflorus* é apresentado no Quadro 1.

Quadro 1: Constituintes químicos isolados de *E. grandiflorus*.

CLASSE	SUBSTÂNCIA	AUTORES
Ácidos fenólicos	Ácido ferúlico, cafeico e isoferúlico	Pimenta <i>et al.</i> (2002 a, b) Pimenta (2002)
Ácidos graxos	Ácido linolênico/dodecanóico, palmítico	Tanaka (2000) Pimenta (2002)
Alcalóides	Echinofilinas A, B, C, D, E, F	Kobayashi <i>et al.</i> (2000 a, b)
Derivados do ácido tartárico	Ácidos caftárico, chicórico, cafeoil feruloil tartárico, 2-O-feruloil tartárico e di-feruloil tartárico	Schnitzler <i>et al.</i> (2004, 2007)
Diterpenóides	Echinodol	Manns e Hartmann (1993)
	Ácido echinóico	Tanaka <i>et al.</i> (1997)
	Fitol, ácido hardwickico, ácido (-)-15-etoxicleroda	Costa <i>et al.</i> (1999), Tanaka, (2000)
	3,13-dien-15,16-olide-18-óico, ácido (-)-(16)-hidróxi-cleroda-3,13-dien-16,15-olide-18-oico	
	Ácido (-)-15 hidroxicleroda-3,13-dien-16,15-olide-18-oico, ácido (-)-cleroda-3,13(16),14-trien-18-oico	Tanaka (2000)
	Chapecoderinas A, B e C	Kobayashi <i>et al.</i> (2000c)
	Echinodolídeos A e B	Shigemori <i>et al.</i> (2002)
Esteróis	Solidagolactona-I	Pimenta <i>et al.</i> (2002 a, b) Pimenta (2002b)
	24-etilcolest-4-en-3,6-diona;	Tanaka (2000)
	3 β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol	Fernandes <i>et al.</i> (2002)
Flavonóides	Estigmasterol e sitosterol	
	Isoorientina	Pimenta <i>et al.</i> (2002 a, b)
	Swertisina, isovitexina	Pimenta (2002)
Fração volátil	Swertiajaponina, isovitexina, swertisina e isoorientina-7,3'-dimetil-éter	Schnitzler <i>et al.</i> (2004)
	Diidroedulano, trans-cariofileno, fitol	Pimenta <i>et al.</i> (2006)
	α -humuleno, E -nerolidol, óxido de cariofeno	

2.2.3 Etnofarmacologia

As folhas de *E. grandiflorus* constituem matéria-prima para um dos chás mais empregados como diurético e depurativo. Seu uso é muito difundido tanto nos grandes centros como no interior do país. Em algumas regiões, o chá é utilizado não só por suas propriedades

medicinais, mas também como bebida refrescante de ampla aceitação popular, como componente do produto “Mineirinho®”, industrializado pela empresa “Refrigerantes Flexa Ltda.”, com ampla área de cultivo da espécie em Tanguá – RJ, e de outro refrigerante chamado “Mate Couro®”, produzido em Belo Horizonte – MG (PIMENTA, 2002; DE LUCA, 2003; LIMA, 2006).

As folhas do chapéu-de-couro são adstringentes, usadas para gargarejos ou banhos, respectivamente contra as inflamações da garganta e úlceras dermatológicas, o infuso de folhas é levemente laxante, usado contra artrite, reumatismo e sífilis e ainda contra certas moléstias da pele e do fígado, cistite, depurativo do sangue e eliminador de ácido úrico (CORRÊA, 1984; COIMBRA, 1994; MARTINS *et al.*, 1994; LEITE, 1995). Segundo Dutra *et al.* (2006), o extrato metanólico dos rizomas de *E. grandiflorus* tem potencial para uso em terapias de dor e da inflamação. As raízes são usadas externamente como cataplasma no tratamento de hérnia (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Atribui-se ainda a esta planta a capacidade de interromper o progresso da arteriosclerose (MORS *et al.*, 2000).

Enfim, o chapéu-de-couro é uma planta utilizada na medicina tradicional há séculos, sendo todas as suas partes empregadas na cura de várias moléstias, tanto na forma de infusões como em preparações da indústria farmacêutica de fitoterápicos (LORENZI; MATOS, 2002).

2.2.4 Farmacologia experimental

2.2.4.1 Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva

Em camundongos, os extratos hexânico, metanólico e aquoso obtidos de folhas secas inibiram o edema de pata induzido por histamina e serotonina (BRITO *et al.*, 1999) e o extrato aquoso das folhas rasuradas mostrou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória ao

inibir as contrações induzidas pela aplicação intraperitoneal de ácido acético (CARDOSO *et al.*, 2003).

Foram observadas atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato metanólico de rizomas e os autores sugeriram seu uso potencial em terapias da dor e da inflamação (DUTRA *et al.*, 2006).

Brugiolo *et al.* (2010) testaram o extrato aquoso no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA em camundongos, observando redução no número de leucócitos no lavado bronco-alveolar, diminuição da atividade da peroxidase eosinofílica no tecido pulmonar, redução dos níveis de IgE específica para OVA no soro, dos níveis da quimiocina CCL11 e da expressão gênica de IL-4 e IL-13 no tecido pulmonar, concluindo que o extrato é capaz de modular alguns aspectos da inflamação pulmonar alérgica, podendo ser útil no tratamento da asma.

2.2.4.2 Atividade diurética

Pimenta (2002) avaliando o volume de urina excretado por camundongos tratados com o chá demonstrou o potencial diurético da planta.

Foi observada atividade diurética do chá das folhas pela comparação do volume de urina eliminado em relação ao volume do chá administrado a camundongos, observando-se 89% de volume de urina eliminado contra 22% do controle com água destilada (CARDOSO *et al.*, 2003). Portela *et al.* (2007) relataram aumento da diurese e melhora do quadro de necrose tubular aguda em animais tratados com o chapéu-de-couro.

2.2.4.3 Atividades hipotensora, anti-hipertensiva e vasodilatadora

O extrato hidroalcolico das folhas a 50% foi administrado em ratos naturalmente hipertensos, observando-se uma queda acentuada da pressão arterial e uma menor frequência cardíaca (RIBEIRO *et al.*, 1986). Pimenta *et al.* (1998a) também demonstraram a atividade hipotensora de extratos brutos. Matos *et al.* (2000) e Lessa *et al.* (2008) observaram os mesmos efeitos ao trabalharem com o extrato etanólico bruto. A atividade hipotensora de extratos brutos hexânico, metanólico e aquoso obtidos de folhas secas foi avaliada, sendo o extrato hexânico e aquoso os que apresentaram maior atividade (TIBIRIÇÁ *et al.*, 2007; POLACCHINE, 2005; POLACCHINE *et al.*, 2006).

O extrato aquoso de folhas apresentou atividade vasodilatadora em aorta isolada de coelho (ALMEIDA *et al.*, 2000; TIBIRIÇÁ *et al.*, 2007) e os extratos hexânico, metanólico, aquoso e etanólico de folhas secas e etanólico de folhas frescas induziram vasodilatação na microcirculação de rins isolados de coelhos (CAILLEAUX *et al.*, 2000).

2.2.4.4 Atividade antimicrobiana

Foi observada atividade do extrato aquoso de *E. grandiflorus* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* (DUARTE *et al.*, 1999) e do extrato metanólico das folhas sobre *Staphylococcus aureus* (DUARTE *et al.*, 2002), *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (SOUZA *et al.*, 2004).

Babicz *et al.* (2006) testaram os extratos acetônico e metanólico, registrando atividade antimicrobiana para o extrato acetônico, no qual a acetona de polaridade intermediária, permitiu a extração de compostos menos polares com atividade antimicrobiana confirmada, como o óxido de cariofileno e spatulenol.

2.2.4.5 Atividade tripanocida *in vitro*

O extrato aquoso liofilizado de folhas foi testado sobre formas tripomastigotas do parasita *Trypanosoma cruzi*, mostrando 90% de atividade após 24h de incubação (PIMENTA *et al.*, 1998b). Já Stutz *et al.* (1999) observaram 100% de atividade tripanocida para os extratos brutos butanólico e aquoso de folhas secas e rizomas.

Gibaldi *et al.* (2001) encontraram atividade tripanocida utilizando a forma tripomastigota metacíclica da cepa DM28/C de *T. cruzi*, trabalhando com os extratos brutos hexânico e as partições provenientes do extrato metanólico em acetato de etila e butanol que resultaram em 100% de atividade.

2.2.4.6 Atividade leishmanicida

Pimenta (2002) avaliou a atividade leishmanicida do extrato hexânico e das frações hexânica e diclorometano obtidas do extrato bruto metanólico, obtendo resultados positivos contra promastigotas de *Leishmania major*.

2.2.4.7 Atividade antineoplásica

Os extratos brutos e as partições mais apolares provenientes do extrato metanólico bruto das folhas inibiram a proliferação, *in vitro*, de linhagens de células tumorais de mieloma (SP2/0), linfoma (BW) e plasmocitoma de camundongos (P3653), demonstrando atividade contra neoplasia (PIMENTA, 2002).

2.2.4.8 Atividade hipocolesterolêmica

O chá a 5% de *E. grandiflorus* baixou os níveis plasmáticos de colesterol de camundongos tratados com solução oleosa de colesterol a 2% (CARDOSO *et al.*, 2005).

2.2.4.9 Atividade imunossupressora

Pinto *et al.* (2007) avaliaram os efeitos do extrato aquoso de *E. macrophyllus* em camundongos tratados por sete dias, observando a inibição da produção de anticorpos e redução do edema. Os autores propuseram que o efeito imunossupressor do extrato *in vivo* atuou sobre as células T e/ou B, agindo sobre estas direta ou indiretamente. Animais tratados com a dose recomendada para humanos do extrato metanólico mostraram inibição significativa na produção de anticorpos dada à presença de substâncias imunomodulatórias, possivelmente flavonóides, capazes de reduzir a resistência imunológica celular *in vivo*, além de induzir uma supressão sobre a função *in vivo* de células B, resultando em uma redução da produção de anticorpos.

2.2.4.10 Atividade larvicida para *Aedes aegypti*

Coelho *et al.* (2009) testaram os extratos brutos hexânico, etanólico, hidroalcoólico e a fração diclorometano de extrato das folhas de chapéu-de-couro sobre larvas de *Aedes aegypti* de 3º estágio. Os resultados foram registrados 24 horas depois, sendo a fração diclorometano do extrato a que apresentou maior atividade larvicida.

2.3 Fisiologia do sistema reprodutor feminino

Conhecimentos básicos da fisiologia da reprodução feminina são essenciais para a compreensão do efeito tóxico de qualquer agente interno ou externo. Informações detalhadas sobre a fisiologia do sistema reprodutor feminino podem ser encontradas em Knobil; Neill (1994), Yen; Jaffe; Barbieri (1999) e Guerra *et al.* (2001), Strowitzki *et al.* (2006); Bertan *et al.* (2006); Guyton e Hall (2009).

2.3.1 Fisiologia dos ovários

Os ovários são responsáveis pela produção do gameta feminino e de hormônios que regulam a fisiologia de todo o trato reprodutor feminino, inclusive glândula mamária.

A produção dos gametas e de hormônios é sincrônica e regulada pela secreção de gonadotrofinas.

O desenvolvimento dos ovócitos ocorre no interior dos folículos, estruturas ovarianas que evoluem de um estágio inicial, como folículo primordial (ovócito detido na fase de dictióteno e uma camada de células envoltórias, denominada granulosa) até folículo pré-ovulatório. Um grupo de folículos primordiais do pool começa a se desenvolver, multiplicando as camadas envoltórias do ovócito, formando as camadas da granulosa, teca interna e teca externa. Esse período de crescimento independe de gonadotrofinas e ocorre de tempos em tempos, seguindo um sincronismo próprio do ovário. Quando o folículo atinge determinado tamanho seu desenvolvimento posterior depende da concentração plasmática de Hormônio Folículo Estimulante (FSH). Havendo concentração adequada o folículo se desenvolve para a fase de folículo em amadurecimento, quando passa a ter um antro central, e para folículo pré-ovulatório. Dependendo, ainda, da concentração de Hormônio Luteinizante

(LH), o folículo sofre o processo de ruptura e expulsão do ovócito – o processo de ovulação. O ovócito I permanece em fase de dictióteno até o momento da ovulação. Nessa ocasião, retoma o processo de meiose sendo eliminado como ovócito II em metáfase e só retoma sua divisão final se for fertilizado pelo espermatozóide.

Os folículos produzem estrogênio seguindo um mecanismo chamado de “duas células - dois hormônios”. A teca interna produz testosterona que se difunde para a camada de células da granulosa. Estas, sob estímulo do FSH produzem a enzima aromatase que transforma a testosterona em estrogênio. A produção de estrogênio aumenta progressivamente até a ruptura do folículo durante a ovulação, portanto, até a ovulação o hormônio predominante é o estrogênio.

Ao se aproximar da ovulação o folículo produz pequenas quantidades de progesterona que potencializam, junto com o estrogênio circulante, um pico agudo e sustentado de LH que desencadeia a secreção de enzimas proteolíticas pelas células da granulosa e da teca interna, além de aumentar a vascularização da teca interna e, conseqüentemente, aumentar o extravasamento de líquidos para o antro folicular. Enzimas proteolíticas degradam as junções intercelulares das células do “cumulus oophorus” e degradam a parede do folículo, permitindo sua ruptura e a liberação do ovócito e contirbue para a retomada da meiose do ovócito. Paralelamente a essas ações, o LH promove a luteinização de células da granulosa e da teca interna e a sua proliferação, transformando o folículo numa estrutura compacta denominada corpo lúteo. As células do corpo lúteo secretam ainda estrogênio, mas o hormônio predominante a partir da ovulação passa a ser a progesterona.

A sequência da secreção desses dois hormônios constitui o ciclo ovariano que governa a fisiologia dos demais órgãos do sistema reprodutor.

Um agente tóxico para o ovário pode agir lesando a célula germinativa ou interferindo com a síntese de hormônios ovarianos e, causando danos genéticos, poderá resultar em malformações do concepto (HOOD, 2006).

2.3.2 Fisiologia dos condutos femininos

Tubas uterinas, útero e vagina apresentam alterações morfológicas e fisiológicas conforme o predomínio do hormônio ovariano. A fase estrogênica do ciclo estral está relacionada com o período de acasalamento e a fase progesterônica, com o período gestacional.

Durante a fase estrogênica as tubas uterinas encontram-se com células ciliadas maiores, com abundantes cílios e com a contratilidade muscular aumentada. Todas essas características ajudam no transporte de gametas e zigoto. Além disso, a vagina encontra-se com seu epitélio estratificado apresentando as células superficiais em picnose ou cornificadas (ratas e fêmeas de camundongo), um processo que dá mais proteção ao órgão no momento da cópula. O útero, na fase estrogênica repara a camada basal (em primatas) perdida durante a menstruação ou reorganiza a região da mucosa depois do diestro em roedores.

Durante fase progesterônica ou progesterônica as tubas uterinas têm predomínio de células secretoras e poucas células ciliadas com cílios mais curtos e menos numerosos. A contratilidade tubária é reduzida. No útero encontram-se vasos sanguíneos dilatados e tortuosos, o que permite extravasamento de plasma para o tecido intersticial, glândulas uterinas dilatadas e cheias de secreção e células intersticiais com glicogênio. Tais características facilitam a implantação do blastocisto e seu desenvolvimento. A vagina de animais em fase progesterônica é desprovida de células picnóticas ou queratinizada e o predomínio é de células intermediárias providas de núcleo.

O aspecto histológico dos condutos femininos é amplamente utilizado em testes sobre toxicologia reprodutiva visando verificar alterações hormonais, visto serem órgãos esteróide-dependentes.

Os protocolos sobre toxicidade reprodutiva feminina verificam os dois aspectos anteriormente descritos. Analisando-se o esfregaço vaginal e dosando-se os hormônios ovarianos é possível detectar efeitos inibidores da síntese dos hormônios. Avaliando-se o número de conceptos obtidos calculam-se efeitos lesivos sobre a célula germinativa. Em estudos mais detalhados pode-se procurar o mecanismo fisiopatogênico que levou a alterações hormonais ou lesões do ovócito, como por exemplo, alterações na síntese, secreção, liberação de hormônios gonadotróficos (LH e FSH) e de esteróides ovarianos, alterações dos pulsos de secreção do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) podem estar alterados. O agente tóxico pode competir pelos receptores hormonais, alterar as secreções tubárias e uterinas, agir como espermicida e muitos outros caminhos que possam indicar como agiu o toxicante. As lesões do ovócito geralmente são ocasionadas por agentes genotóxicos (PARKER, 2006).

2.4 Desenvolvimento embrionário inicial

O desenvolvimento de mamíferos inicia-se com os processos de fertilização, nos quais ocorrem eventos moleculares coordenados. Estes eventos continuam com as fases de segmentação e transporte do embrião pelo trato genital feminino, sua implantação no útero, a gastrulação, a organogênese, o crescimento e a maturação dos órgãos e sistemas. A completa maturação de alguns órgãos e sistemas somente se faz após o nascimento.

A fertilização nos mamíferos ocorre na ampola da tuba uterina. Com a penetração do espermatozóide o ovócito é ativado, o segundo corpúsculo polar é produzido, os pronúcleos masculino e feminino são formados, o material genético dos dois gametas funde-se e forma-se

o zigoto que iniciará diferentes eventos morfológicos e bioquímicos. Iniciam-se as segmentações sucessivas e o transporte pela tuba uterina até o útero, onde o blastocisto se implanta dando início à embriogênese (ROSSI-FERRAGUT *et al.*, 2001; RONDEROS, 2006; DUMM, 2006; MOORE; PERSAUD, 2008).

2.4.1 Segmentação e transporte do embrião

Após a fertilização, os embriões de mamíferos migram pela tuba uterina, enquanto passam pelos primeiros estágios da clivagem. É a fase de pré-implantação, que acontece nos primeiros sete dias de gestação em humanos e nos primeiros quatro a cinco dias, em roedores. Divisões subsequentes vão se seguindo e formam células-filha (blastômeros) progressivamente menores, devido ao fato do embrião ainda se encontrar envolvido pela zona pelúcida, deste modo, ocorre um aumento no número de blastômeros sem aumento correspondente da massa citoplasmática (CARSON; NAFTOLIN, 1982; GUERRA; PETERS, 1999; MOORE; PERSAUD, 2000; 2008; DUMM, 2006).

Em ratos a fase de zigoto a dois blastômeros ocorre no primeiro dia de prenhez, na ampola da tuba uterina. No segundo dia, o embrião permanece em fase de dois blastômeros, na tuba uterina, as divisões subsequentes até quatro células ocorrem entre o segundo e o quarto dia, quando eles se encontram transitando pela tuba uterina. A fase de mórula é atingida no quarto dia, também na tuba uterina (SINGH *et al.*, 1993; SOUZA *et al.*, 1997; CARSON; NAFTOLIN, 1982), embora Singh *et al.* (1993), tenham detectado alguns blastocistos precoces, nesse mesmo dia.

Após cinco divisões mitóticas, aproximadamente, os blastômeros se alinham, apertando-se uns contra os outros para formar uma esfera compacta de 16 blastômeros, conhecida como mórula (MOLEY, 1999; O'RAHILLY; MULLER, 2001; GUYTON; HALL,

2009). Este fenômeno denominado compactação, ocorre quando as células reorganizam as organelas intracitoplasmáticas, tornam-se polarizadas, trocam a forma esférica pela cilíndrica e aderem-se umas às outras mais firmemente por junções “tights”. Os blastômeros compactados organizam-se de forma que uma a duas células localizam-se no centro da estrutura e as demais circundam-nas. As células centrais darão origem ao maciço celular interno (MCI) e as demais, às células do trofotoderma (ACOSTA, 1994; ALBERTS *et al.*, 1997; MOLEY, 1999; O’RAHILLY; MULLER, 2001; GUYTON; HALL, 2009).

Na mórula, as células que originarão o MCI começam a secretar fluido e, logo aos 64 blastômeros, estabelece-se o início de uma cavidade, chamada de blastocelo, identificando-se aí a fase de blastocisto inicial (DUMM, 2006). Esta mudança coincide com a entrada do blastocisto, na cavidade uterina (CARSON; NAFTOLIN, 1982).

2.4.2 Aspectos fisiológicos e bioquímicos relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial

Durante seu trajeto pela tuba uterina, o conceito exige um ambiente específico para que as diferentes etapas de seu desenvolvimento possam ocorrer adequadamente (PARIA; SONG; DEY, 2001). Para tanto, embrião e epitélio tubário interagem enviando sinais moleculares (por exemplo, TGF- α e TGF- β) (BROWN, 1994) em uma e outra direção, processo que deu origem ao termo “diálogo materno - fetal” (ACOSTA, 1994).

As fases iniciais do desenvolvimento embrionário (até a terceira divisão celular) são controladas pelo genoma materno. Desta fase em diante, o controle passa a ser efetuado pelo genoma do embrião (LAURINCK *et al.*, 2000) que passa a produzir sinais moleculares, recebidos pelas células epiteliais da tuba uterina, que respondem produzindo secreções específicas de substâncias necessárias ao desenvolvimento do embrião. Assim, o controle das

clivagens, a formação da mórula e do blastocisto, etapas do desenvolvimento embrionário que ocorrem na tuba uterina, estão estreitamente correlacionadas com fatores produzidos pelo próprio embrião e pelo epitélio tubário (KOBAYASHI *et al.*, 1997).

Na fase precoce do desenvolvimento as necessidades metabólicas variam: a fase de uma célula requer piruvato, a de duas células pode usar fosfoenolpiruvato e lactato e a de oito células em diante já passa a usar glicose (BIGGER; BORLAND, 1976). A partir de 12 células o consumo de glicose aumenta progressivamente de tal forma que o consumo do carboidrato é 15 vezes maior na fase de blastocisto, quando comparado à fase unicelular (KHURANA; NIEMANN, 2000).

2.4.3 Trânsito do embrião pela tuba uterina e útero

De acordo com Moore e Croxatto (1988), o transporte tubário não se faz de maneira regular. O zigoto permanece algum tempo, variando de acordo com a espécie, “estacionado” na região da ampola, aprisionado pelo fechamento da junção istmo - ampolar. Depois de algumas horas ou dias (no ser humano 95% do tempo de transporte é gasto nesta região e no camundongo 25%), a junção istmo - ampolar abre-se e deixa passar o(s) zigoto(s) para a região do istmo. Em seguida, fecha-se de novo e parece só reabrir na próxima ovulação. Croxatto *et al.* (1991) afirmam que este fato parece ser importante para o transporte mecânico dos embriões como também por isolá-los num ambiente especial, provavelmente necessário para o seu desenvolvimento.

Na etapa seguinte, quando já ocorrem as clivagens sucessivas, o embrião fica no istmo por um tempo variável até que, com a abertura da junção útero - tubária, passa para o útero, onde ocorrerá a implantação.

As contrações circulares e progressivas das fibras musculares lisas da tuba uterina são importantes para a progressão do embrião em direção ao útero. O fluido tubário também auxilia o deslocamento dos embriões, além de participar da sua nutrição e também seu desenvolvimento (HARPER, 1994).

Hormônios interferem com a contratilidade tubária: ela fica aumentada sob efeito do estrogênio e retardada pela presença de progesterona (CARSON; NAFTOLIN, 1982; FORCELLEDO; CROXATTO, 1988; VINIJSAMUN *et al.*, 1990; CROXATTO *et al.*, 1991). Em ratas, níveis elevados de estrogênio retardam o crescimento do embrião em fase de pré-implantação que pode, inclusive, sofrer degeneração (TONG *et al.*, 2000).

O embrião de rata produz grande quantidade de prostaglandina E1, que diminui a contratilidade das fibras musculares e isto poderia implicar em que o embrião pode influir no seu transporte (VIGGIANO *et al.*, 1992).

2.4.4 A implantação do blastocisto

Como já mencionado, o desenvolvimento do blastocisto começa quando aparece uma cavitação entre os blastômeros da mórula. Na fase inicial, quando a cavidade ainda é rudimentar, costuma ser denominado de blastocisto precoce ou inicial - nesta fase ele ainda pode ser encontrado na tuba uterina, próximo a junção útero-tubária, mas na maioria das vezes já está na cavidade uterina (SOUZA *et al.*, 1997). Na fase seguinte a cavidade se amplia e o blastocisto é denominado blastocisto expandido, quando inicia o processo de implantação.

A implantação do blastocisto é uma sequência de interações bioquímicas e físicas entre blastocisto e útero, que conduz à formação de um contato íntimo e especializado entre trofoblasto e endométrio (ACOSTA, 1994). Implica também em processos que impeçam a rejeição materna. Dessa forma, linfócitos T helper 1 (Th1) aumentam as chances de

abortamento, enquanto que os linfócitos Th2 favorecem uma gravidez normal, sendo o sucesso da implantação correlacionado a baixos níveis de citocinas Th1 e elevados níveis de citocinas Th2 (LIM *et al.*, 2000; MICHELON *et al.*, 2002). Em camundongos, a expressão materna do fator inibidor de leucemia é crucial para a implantação do blastocisto (STEWART *et al.*, 1992; TSAI *et al.*, 1999).

A implantação do blastocisto só ocorre quando ele e o endométrio estão “maduros” - fisiologicamente capacitados para se unirem - e isso já foi pressentido por Fawcett (1950) **apud** Heap *et al.* (1979), há 60 anos atrás. Desde sua entrada no útero, blastocisto e endométrio interagem, mas mesmo antes disso, é a presença do blastocisto que mantém o corpo lúteo funcionando e garante o ambiente progesteronal do útero, necessário ao implante do blastocisto.

São produzidos no útero: [1] Fatores que estimulam o crescimento e protegem da apoptose como o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) e insulina. Nos microvilos do trofoblasto são encontrados receptores para o IGF (HERRLER *et al.*, 1998), [2] Proteína ligadora de IGF-1, que pode estar relacionada ao processo de proliferação celular nos estágios iniciais de adesão (FAZLEABAS; VERHAGE, 1991); [3] Proteína trofoblástica 1 (TP-1), que suprime a secreção de prostaglandina 2α (PGF 2α), hormônio que induz contratilidade da musculatura uterina e estimula a lutólise (BAZER; ROBERTS, 1983), [4] Fator de crescimento epidérmico (EGF), que contribui para a sobrevivência do blastocisto (SPANOS *et al.*, 2000).

O blastocisto, por seu turno, produz óxido nítrico (NO) que induziria vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa uterina, colaborando com a implantação (GAGIOTI *et al.*, 2000), estrogênio que contribuiria para a sensibilização do endométrio (HEAP *et al.*, 1979; SARTOR; DULUC, 1980; SENGUPTA *et al.*, 1981) e prostaglandinas que teriam efeito local

no endométrio, provavelmente estimulando vasodilatação (PAKRASI; DEY, 1982; HARPER, 1983; KINOSHITA *et al.*, 1985).

Para poder se implantar o blastocisto necessita ativar-se e perder a zona pelúcida. A zona pelúcida vai se adelgaçando progressivamente até que se rompe em algum ponto e o blastocisto escapa por ele, um fenômeno que foi denominado “eclosão” pela semelhança com a eclosão dos ovos de aves. A ativação do blastocisto compreende modificação na expressão de moléculas antígenos de histocompatibilidade (WEITLAUF, 1994), a transformação de sua carga elétrica neutra para negativa (CLEMETSON *et al.*, 1971), a produção pelo endométrio de proteínas blastoquinina ou uteroglobina (FINN, 1977), além de outros fatores.

Por seu turno, o útero só tem condições fisiológicas de receber o blastocisto durante um curto período da fase progestacional denominado de “Janela de implantação”, quando as células do endométrio exibem receptores para o trofoblasto. O período de receptividade endometrial - a janela de implantação - foi definido como: “uma janela temporal de maturação do endométrio durante a qual o trofoblasto pode unir-se às células epiteliais do endométrio” (STRAUSS III; COUTIFARIS, 1999). A duração da janela de implantação no rato foi calculada em 12 horas (PSYCHOYOS, 1966) e em humanos quatro dias (STRAUSS III; COUTIFARIS, 1999).

As alterações morfológicas do endométrio, na janela de implantação, são um conjunto de transformações da membrana plasmática das células epiteliais do endométrio, tais como: alterações nos contornos, ultra-estrutura e composição bioquímica; aumento da densidade e tipos de proteínas; decréscimo de carga da superfície, expressão de novos carboidratos e epítomos e produção de pinopodos (QUINN; CASPER, 2009).

2.4.6 As fases da implantação

A implantação ocorre em três etapas: união, penetração e inclusão (PARR; PARR, 1989; ACOSTA, 1994).

União compreende duas fases: aposição, pré-união ou primeiro estágio de oclusão e adesão ou segundo estágio de oclusão (PARR; PARR, 1989).

Na aposição o blastocisto se imobiliza, mas não se prende no endométrio. Nessa fase, se o útero tiver sua luz lavada o blastocisto é facilmente liberado (ENDERS, 1972; ACOSTA, 1994; WEITLAUF, 1994). Em ratos e camundongos, durante a aposição, o contato entre blastocisto e epitélio uterino aumenta progressivamente porque o útero se altera para “abraçar” o blastocisto (FINN, 1977; WEITLAUF, 1994; ACOSTA, 1994). Durante a aposição, microvilosidades da superfície do trofoblasto e da região apical das células epiteliais do endométrio se interdigitam, aumentando muito a superfície de contato entre ambas estruturas (ENDERS, 1972).

A adesão se caracteriza pela fixação definitiva do blastocisto ao endométrio. Nessa etapa, se o lúmen do útero for lavado, os blastocistos não se desprendem com facilidade.

Durante a adesão são observados: desaparecimento do glicocálice da superfície luminal das células epiteliais e do trofoblasto (FINN, 1977; PARR; PARR, 1989), redução das cargas negativas do glicocálice (WEITLAUF, 1994) e das células epiteliais do endométrio (PARR; PARR, 1989).

Penetração

Após a adesão entre as células epiteliais do endométrio e a superfície do trofoblasto, os processos citoplasmáticos do trofoblasto se estendem entre e debaixo das células epiteliais, que são deslocadas, sofrem apoptose, se destacam em grupos ou isoladamente e são fagocitadas pelo trofoblasto (SCHLAFKE; ENDERS, 1977; WEITLAUF, 1994). A penetração

do trofoblasto seria facilitada pela redução de desmossomos, observado no quinto dia de prenhez (ILLIIGWORH *et al.*, 2000).

Em seres humanos, observou-se que as células epiteliais do endométrio expressam fator sinalizador de morte - FAS e o trofoblasto expressa seu ligante FAS-L. Quando se forma o complexo FAS-FAS-L as caspases da morte são ativadas em segundos e desencadeiam a morte celular em horas. Tal processo foi denominado de “beijo da morte”, dado pelo blastocisto no endométrio (GALVÁN *et al.*, 2000).

Com a morte das células epiteliais a lâmina basal fica exposta, ocorrendo sua invasão pelo trofoblasto que chega até ao estroma (PARR; PARR, 1989).

Inclusão

À medida que o trofoblasto vai penetrando no estroma as células dessa região proliferam e diferenciam-se, formando a decídua. O endométrio é infiltrado por várias células da medula óssea, fica edemaciado e assim, progressivamente o embrião fica incluído numa grande massa de tecido decidual que se distingue de outras regiões do endométrio onde não ocorre decidualização. O processo de decidualização parece ter componente similar ao da inflamação visto que a Isoleucina-11, considerada como anti-inflamatório, quando administrada a ratas produz anomalias na decidualização, no trofoblasto e nos embriões (CALUWERTS *et al.*, 2000).

Em resumo, a implantação do blastocisto exige um ambiente altamente especializado, capaz não só de manter a sobrevivência do blastocisto como promover o reconhecimento entre blastocisto e endométrio, possibilitar a aderência e penetração do blastocisto, responder a sua sinalização, com respeito a suas necessidades nutritivas e outras.

Por fim, a gestação é um processo que implica em supressão da reação imunológica materna ao feto, que é algo como um enxerto heterólogo, cujo mecanismo ainda não está bem

estabelecido (BARINI *et al*, 1998; VEENSTRA; HEINEMAN; FAAS, 2000; MICHELON *et al*. (2006).

Pelo exposto não é difícil compreender que para o êxito de uma concepção são necessários mecanismos intrincados e altamente sincronizados e que qualquer fator que altere os componentes integrantes desse mecanismo complexo resulta em fracasso na concepção, tanto quanto a infertilidade quanto a aborto e malformações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência da planta

As folhas de *E. grandiflorus* foram coletadas em junho de 2006, em plantio sob condições de inundação intermitente, em Juiz de Fora, MG (21° 45' 20"S e 43° 20' 40"W). Uma exsicata da planta, identificada pelo Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta, encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Juiz de Fora (CESJ/UFJF), Minas Gerais, Brasil, sob o número 49.707. Após secagem em bancada, seguida de utilização de estufa a 55°C até atingir peso constante, foi obtida a amostra de folhas secas rasuradas.

3.2 Animais de experimentação

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) de linhagem originalmente Wistar, com dois meses de idade, pesando em média 120 g, obtidas na colônia do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF.

3.3 Condições de criação e alojamento dos animais

As ratas foram mantidas em gaiolas de polipropileno, acondicionadas em armários climatizados. As gaiolas são providas de cama de maravalha selecionada, mamadeira para água e cocho para ração do tipo peletizada, oferecida diariamente *ad libitum*.

A temperatura do alojamento é mantida em torno de 22°C ± 2°C. A iluminação é mista combinando luz natural e lâmpadas incandescentes, sendo as últimas controladas automaticamente para acenderem às 6 horas e apagarem às 18 horas, compreendendo um

fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. A umidade relativa do ar é de 40% a 60%.

3.4 Obtenção do extrato aquoso liofilizado de *E. grandiflorus* (EAEg)

O extrato aquoso foi elaborado com 1800 g de folhas secas de *E. grandiflorus* submetidas à extração aquosa por infusão com cinco litros de água destilada, permanecendo por 12 horas em maceração estática, sendo depois filtrado e acondicionado em freezer (-18°C) e liofilizado, utilizando-se Liofilizador Freeze Dryer 18 Labconco da EMBRAPA-CNPGL-JF. O rendimento do resíduo liofilizado foi de 13,45%, ou seja, 13,45g de resíduo para cada 100g de folhas secas.

3.5 Avaliação qualitativa do extrato aquoso liofilizado de *E. grandiflorus* (EAEg)

Foram realizados testes segundo o roteiro sequencial de Matos (1997) para avaliação qualitativa de saponinas, terpenos, compostos fenólicos, flavonóides, taninos, alcalóides, esteróides, antraquinonas e cumarinas, cujos testes determinam a presença de compostos por meio de reações com o aparecimento de cor e/ou precipitado. A avaliação qualitativa para cada um desses compostos foi realizada como se segue.

3.5.1 Alcalóides

Em uma placa de 96 poços, 50 µl da amostra foram colocados em três poços diferentes e 150 µl de diferentes reagentes utilizados para identificação de alcalóides (Reativo de Hager, Mayer e Dragendorff) foram adicionados em cada poço. O aparecimento de precipitado ou

turvação branca com os reativos de Hager e Mayer e de cor alaranjada com o reativo de Dragendorff indica a presença de alcalóides.

3.5.2 Triterpenos e Esteróis

Em uma placa de 96 poços, 150 µl da amostra foram colocados em um poço. Em seguida foram acrescentadas uma gota de anidrido acético e uma a duas gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de cor azul-esverdeada indica a presença de esteróides. O aparecimento de cor vermelha indica a presença de triterpenos.

3.5.3 Saponinas

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 ml da amostra e aproximadamente 2 ml de água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente por 30 min e colocado em repouso por 20 min. A presença de espuma persistente com aproximadamente 1 cm de altura indica a presença de saponinas.

3.5.4 Cumarinas

A amostra foi gotejada em um pedaço de papel de filtro. Em seguida, uma gota da solução de KOH 10% foi adicionada à amostra. O aparecimento de fluorescência de cor azul-esverdeada após exposição à luz ultra-violeta (365 nm) indica a presença de cumarinas.

3.5.5 Compostos fenólicos

Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida de uma solução de FeCl_3 2%. O aparecimento de uma mancha azul escura indica a presença de compostos fenólicos.

3.5.6 Taninos

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 ml da amostra gota a gota, e posteriormente, acrescentada uma gota de ácido clorídrico a 10% e solução de gelatina a 2,5%. A formação de precipitado branco indica a presença de taninos totais.

3.5.7 Antraquinonas

Em uma placa de 96 poços, 150 μl da amostra foram colocados em um poço. Em seguida foram adicionados 50 μl de NaOH 0,5M. O aparecimento de coloração vermelha indica a presença de antraquinonas.

3.5.8 Flavonóides

Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida da adição de uma solução de AlCl_3 5%. O aparecimento de fluorescência de cor amarela sob luz ultra-violeta (365 nm) indica a presença de flavonóides.

3.6 Doses e via

A seleção de doses foi baseada em Polacchine (2005) que avaliou a toxicidade aguda do extrato aquoso bruto de *E. grandiflorus* administrando até 4 g do extrato por quilo de peso corporal a camundongos, não registrando sinais clínicos de toxicidade nem mortes em nenhuma das doses utilizadas, e no ICH Guideline S5 (2005) que determina a avaliação toxicológica em animais utilizando-se doses geralmente dez vezes maiores do que a dose recomendada para humanos para se prever o risco reprodutivo. As doses utilizadas neste experimento foram 250 mg, 500 mg e 1000 mg/Kg/dia, dissolvidos em 0,5 mL de água destilada, administradas por via intragástrica, uma vez ao dia, o que representa 10, 20 e 40 vezes a dose recomendada para humanos que é de 25 mg/kg/dia (Lopes *et al.*, 2000).

3.7 Organização dos grupos e tratamento

Foram formados quatro grupos experimentais: grupo C, controle, que recebeu 0,5 mL de solução salina e grupos T-250, T-500 e T-1000, tratados, que receberam as doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg/dia do extrato aquoso liofilizado de *E. grandiflorus*, dissolvidas em 0,5 mL de água destilada, respectivamente. As ratas foram pesadas e separadas em caixas de polipropileno, em grupos de três, e foram marcadas nas orelhas, segundo o código de marcação estabelecido no laboratório.

Foi feito esfregaço vaginal nos animais durante 15 dias consecutivos para observação do ciclo estral, posteriormente os animais foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos experimentais. O tratamento foi realizado durante outros 15 dias consecutivos, obtendo-se esfregaços vaginais diários. Findo este período, mantendo-se o tratamento, as ratas foram pesadas e acasaladas no sistema poligâmico, com machos de fertilidade previamente

comprovada, e a constatação da inseminação foi feita através da observação de espermatozoides presentes no esfregaço vaginal, sendo este considerado o dia zero pós-inseminação. Os animais inseminados foram identificados e pesados, permanecendo sob tratamento até o 14^o dia de prenhez.

Os animais foram inspecionados durante todo o período do experimento para a observação de sinais clínicos de toxicidade como alteração do consumo de ração e de água, alteração do peso corporal, hiper ou hipo-atividade, pilo-ereção, estereotipia, cromodacriorréia, sangramento vaginal, aumento da diurese, convulsão, diarreia e morte (CHRISTIAN, 2001; SMITH e LUO, 2004).

Obteve-se o peso corporal das ratas 15 dias antes e 15 após o tratamento bem como o ganho de peso corporal. Ratas não inseminadas foram eutanasiadas por exsanguinação total, sob anestesia com 0,2 mL de xilasina e 0,9 mL de ketamina administrada por via intraperitoneal e seus cornos uterinos foram examinados sob microscópio estereoscópico para confirmação visual da ausência de locais de implantação.

Com o total de ratas inseminadas e o número de ratas prenhes foram calculados o índice de acasalamento (n° de fêmeas acasaladas/ n° de fêmeas inseminadas X 100) e o índice de fertilidade (n° de fêmeas prenhes/ n° de fêmeas inseminadas X 100) (PARKER, 2006).

Em ratas prenhes foram registrados o peso corporal corrigido (diferença entre peso corporal menos o trato reprodutor), o ganho de peso (diferença entre peso corporal corrigido e peso no dia da inseminação). Os animais foram eutanasiados no 15^o dia de prenhes conforme descrito e submetidos a laparohisterectomia para observação de lesões de órgãos internos e remoção do trato reprodutor. Obteve-se o peso absoluto e o peso relativo (peso absoluto do órgão/peso corrigido X 100) de fígado, rins, baço, supra-renais e ovários. Nos ovários foram contados os corpos lúteos. Nos cornos uterinos foram contados implantes, fetos vivos e

mortos, reabsorções e fetos malformados (fenda palatina, lábio leporino, polidactilia, anormalidades de membros, fechamento do tubo neural dentre outros).

3.8 Parâmetros sanguíneos

O sangue colhido foi destinado à determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os valores para hematimetria, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e índices hematimétricos (volume globular médio-VGM, hemoglobina globular média-HGM e concentração de hemoglobina globular média-CHGM) foram determinados em analisador automático de células hematológicas (DA-500, Celm, Brasil). As dosagens de colesterol, triglicérides, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), uréia e creatinina foram realizadas imediatamente após a centrifugação do sangue (SB-190, Celm, Brasil).

3.9. Estudo histopatológico

Durante o procedimento de necropsia, foram removidos e pesados fígado, rins, baço, ovários e supra-renais de todos os animais do experimento. Para o estudo histopatológico, fígado, rins e baço foram fixados em formol tamponado a 10% e incluídos em parafina para obtenção de blocos que depois foram submetidos à microtomia (HN-340E, Mícron, Germany). Os cortes foram corados pela técnica de rotina de hematoxilina e eosina (HE) e as lâminas foram montadas em lamínulas com Entellan (Merck 1.07961).

Todas as amostras foram observadas em toda sua extensão em microscópio óptico (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) em aumentos de 50, 100, 200 e 400 vezes pelo patologista.

Após observação foram selecionadas, para captura fotográfica digital em aumento de 400 vezes, áreas morfológicamente representativas da condição metabólica de cada órgão para identificação de possíveis alterações microscópicas.

3.10 Análise dos dados

Foi utilizado o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 13.0 e os dados foram analisados pelo teste de ANOVA, uma via, seguida pelo teste de Dunnet, para comparação de médias de dados contínuos que não violassem a homocedasticidade e normalidade da amostra, caso contrário foi usado o teste de Kruskal-Wallis. As porcentagens foram analisadas pelo teste qui-quadrado. O nível de significância admitido para os testes foi $\alpha = 0,05$.

3.11 Aprovação do protocolo pela Comissão de Ética na Experimentação Animal

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da UFJF (Certificado 01/2007) que segue as normas internacionais de ética na experimentação animal (ANEXO A).

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo de livro

ETHNOBOTANY AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY OF *ECHINODORUS GRANDIFLORUS* (CHAPÉU-DE-COURO).

Capítulo de livro publicado no Medicinal Plants: Classification, Biosynthesis and Pharmacology, 2009.

In: Medicinal Plants Classification, Biosynthesis...
Editor: Alejandro Varela and Jasiah Ibañez

ISBN: 978-1-60876-027-5
© 2007 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 9

Ethnobotany and Experimental Pharmacology of *Echinodorus Grandiflorus* (chapéu de couro)

Sônia Sin Singer Brugiolo, Luciana Valente Borges^{}, Daniel Sales Pimenta, Alessa Sin Singer Brugiolo, Vera Maria Peters and Martha de Oliveira Guerra*

Professors/Researchers from Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil.

Abstract

Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schlttdl.) Micheli and *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli, are monocotyledonous species belonging to Alismataceae family. These plants are aquatic or semi-aquatic herbs, with submersed, floating or emersed leaves and with inflorescences that remain flourished during nearly 30 days. In Brazil, they are popularly known as "chapéu de couro" and have been used in the folk medicine in the treatment of several disorders. Its leaves are resources for very common teas, used as diuretic and anti-inflammatory, blood depurative, against arthritis and skin diseases, liver maladies and renal affections, as well as against amygdalitis, pharyngitis, stomatitis and gingivitis. Several researches have suggested promising results on medicinal activities of "chapéu de couro". Some of those activities were observed in vivo, such as diuretic, anti-inflammatory, hypotensive and antihypertensive, antimicrobial, decholesterolizing, immunosuppressive and vasodilator. In vitro activities were also confirmed, such as trypanocidal, leishmanicidal and antineoplastic. In this work it is presented the ethno and experimental pharmacology, regarding the researches accomplished so far, besides the botanical characterization, geographic distribution, macro and microscopic description, chemical constituents and toxicology.

^{*} Corresponding author: Rua Orestes Fabiano Alves, 21/201 São Pedro, CEP: 36037-120 Juiz de Fora, MG Brazil, email: luvalenteb@yahoo.com.br

4.2 Manuscrito aceito para publicação

REPRODUCTIVE TOXICITY OF *ECHINODORUS GRANDIFLORUS* IN PREGNANT RATS. The Journal of Toxicological Science

ISSN 0388-1350

Reproductive toxicity of *Echinodorus grandiflorus* in pregnant rats

Sônia Sin Singer Brugiolo¹; Vera Maria Peters²; Daniel Sales Pimenta³; Beatriz Julião Vieira Aarestrup⁴; Alessa Sin Singer Brugiolo⁵; Dayana Mendes Ribeiro⁶ and Martha de Oliveira Guerra⁷

¹ Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de concentração Saúde Brasileira/Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil soniabrugiollo@yahoo.com.br

² Centro de Biologia da Reprodução/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil; Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de concentração Saúde Brasileira/Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil peters.vera@ufjf.edu.br

³ Departamento de Botânica/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil daniel.pimenta@ufjf.edu.br

⁴ Centro de Biologia da Reprodução/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil; Departamento de Morfologia/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil; Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de concentração Saúde Brasileira/Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil editorboletim@hotmail.com

⁵Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil alessafst@hotmail.com

⁶ Centro de Biologia da Reprodução/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil dayanaribeiro@yahoo.com.br

⁷ Centro de Biologia da Reprodução/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil; Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de concentração Saúde Brasileira/Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil martha.guerra@ufjf.edu.br

Abstract

To evaluate the possible toxicity of the aqueous extract of *Echinodorus grandiflorus* in pregnant rats, animals were distributed in groups treated with 250, 500 and 1000 mg/kg/day, by gavage, and a control group received saline solution. The treatment was carried out for 15 consecutive days, remaining during mating and until the 14th day of gestation. On the 15th day, pregnant animals were euthanized by exsanguination under anesthesia. A blood sample was destined to the hematological and biochemical analysis. The ovaries, liver, kidneys, spleen, and adrenal glands were removed and weighed. Liver, kidneys and spleen were processed for histopathological analysis. The number mated, cohabitated and pregnant rats were counted as well as the corpora lutea, implants, resorptions, and live and dead fetuses. Fetus body weight and placenta were measured. Treatment with 1000 mg of extract caused anemia, leukocytosis, and an increase in AST and in cholesterol. The liver of animals treated with the two higher doses exhibited discrete inflammatory reaction, located mainly at the stroma which supports the portal space; in the kidneys of animals of T-500 and T-1000 groups there was an expressive decrease in the capsular space, and focal areas of vasodilatation and congestion, as well as a discrete hyalinization, and in the spleen of T-1000 group the red pulp presented excessive pigmentation suggestive of hemosiderin. There were no alterations in reproductive parameters, in fetus external morphology or in placenta weight. In conclusion, the extract causes maternal toxicity, though it does not alter the reproductive performance.

Key words: *Echinodorus grandiflorus*, rats, toxicity, histopathology.

Aceite do manuscrito

26 de Julho de 2010

Final Decision and Final Manuscript File(s) Submission/J. Toxicol. Sci.(JTS-10073)

Dear Dr. Brugiolo,

We are pleased to inform you that the manuscript mentioned below has been accepted for publication in The Journal of Toxicological Sciences. Thank you for considering The Journal of Toxicological Sciences for publication of your excellent work.

For publication, your accepted manuscript needs to be edited by our editorial office, Sendai Kyodo Printing Co., Ltd.. Please send your final manuscript file(s) [text file (MS-Word), figure file(s), and table file(s)] to the editorial office through the following website.

* Website for file up: https://www.e-kenkyu.com/j_toxicological_attach_files/ If you have any questions regarding "file up", please send an e-mail to the editorial office <j.toxicol.sci_publisher@senkyo.co.jp>.

Sincerely yours,

Akira Naganuma, Ph.D.

Editor The Journal of Toxicological Sciences

E-mail: naganuma@mail.pharm.tohoku.ac.jp

Office of SciEd: scied_j.toxicol.sci@senkyo.co.jp

MS.No.: JTS-10073

Type of Manuscript: Letter

Title: Reproductive toxicity of *Echinodorus grandiflorus* in pregnant rats

Authors: Sônia Sin Singer Brugiolo, Vera Maria Peters, Daniel Sales Pimenta, Beatriz Julião Vieira Aarestrup, Alessa Sin Singer Brugiolo, Dayana Mendes Ribeiro, Martha de Oliveira Guerra

Corresponding Author: Sônia Sin Singer Brugiolo

5 COMENTÁRIOS

A espécie *Echinodorus grandiflorus*, conhecida como chapéu-de-couro, é uma planta medicinal muito utilizada pela população para o tratamento de diversas afecções, porém com poucos trabalhos sobre seu potencial toxicológico. Na revisão bibliográfica apresentada é evidente a escassez de trabalhos sobre a toxicidade deste fitoterápico e a inexistência de trabalhos sobre a toxicidade reprodutiva, surgindo daí a motivação para esta pesquisa, realizada em ratas não prenhes e prenhes.

Em ratas não prenhes tratadas com 1000 mg/kg/dia observou-se uma redução na proporção de fases estrais, que possivelmente ocorreu devido presença de compostos fenólicos no extrato, como flavonóides, que tem a habilidade de inibir a aromatase, enzima que converte androgênios em estrogênios.

Entretanto, nem o índice de acasalamento nem o índice de fertilidade se alteraram, o que permite inferir que o tratamento nas três doses testadas não teve efeito tóxico sobre o sistema reprodutor das ratas e que a performance reprodutiva do animal não foi alterada.

O tratamento contínuo dos animais desde o período prévio ao acasalamento até 24 horas anteriores à eutanásia mostra que mesmo com a dose 40 vezes superior à recomendada para humanos (T-1000) não se observaram indícios clínicos de toxicidade, mesmo tendo-se registrado anemia em todos os grupos tratados. As doses de 500 e 1000 mg acarretaram hepato e nefrotoxicidade; a maior dose também induziu toxicidade esplênica, aumento do colesterol plasmático e leucocitose.

Os índices de perdas pré-implantacionais, pós-implantacionais, a proporção de reabsorções, que indicam, respectivamente, a toxicidade para as fases prévias à implantação do embrião, posteriores à implantação e mortes embrionárias, foram semelhantes em todos os grupos experimentais, sugerindo que a capacidade materna, não obstante as possíveis

alterações renais, hepáticas, esplênicas e anemia, não interferiram com o desenvolvimento embrionário e fetal.

O fato dos pesos corporal fetal e de placentas serem semelhantes entre os grupos experimentais parece corroborar a hipótese de que o extrato aquoso liofilizado não interfere com o desenvolvimento embrionário. O extrato não apresentou efeito lesivo sobre os fetos, pois a observação externa não evidenciou qualquer alteração no fechamento do palato, implantação das orelhas, conformação craniana, olhos, fechamento do tubo neural, membros anteriores e posteriores, perfuração anal e cauda. Os dados morfológicos, entretanto, não garantem a inexistência de alterações funcionais ou que não possam surgir na vida pós-natal, portanto é necessário dar continuidade ao estudo do desenvolvimento pós-natal e da vida adulta das crias para confirmar a inocuidade do extrato para gestantes.

Os resultados obtidos até o presente sugerem que o extrato levou a alguma alteração da ciclicidade de ratas não prenhes, acarretou toxicidade hepática, renal e anemia em animais do grupo T-500, e toxicidade hepática, renal e esplênica, além de anemia, em ratas prenhes tratadas com dose mais elevada, mas que tais alterações não interferem com a performance reprodutiva dos animais e não altera o desenvolvimento físico dos fetos até a fase examinada, nem a morfologia externa dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. A. Implantación humana del pre-embrión: aspectos básicos, clínicos e investigación futura. **Rev. Lat. Amer. Est. Fert.**, v. 8, 4-20, 1994.
- ALBERTS, B.; BRAY, D. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 3.ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 1997.
- ALMEIDA, A. L. F.; PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Efeito Vasodilatador de Extratos Brutos de *Echinodorus grandiflorus* na aorta isolada de coelho. XVI LATINOAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 2000, Águas de Lindóia, SP. **Anais do XVI Latinoamerican Congress of Pharmacology**, Águas de Lindóia, 2000. p. 222.
- ALVES, C.; VEIGA, S.; TORALLES, M. B. P.; LOPES, A. C. V. O papel do complexo principal de histocompatibilidade na fisiologia da gravidez e na patogênese de complicações obstétricas. **Rev. Bras. Saúde Mat. Inf.**, v. 7, n. 4, p.1-8, 2007.
- APG III - Angiosperm Phylogeny Group (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** v. 161: 105-121.
- ASSAD, A. L. D.; FERRO, A. F. P. Biodiversidade e sua utilização na Geração de Fitoterápicos. **Fármacos & Medicamentos**, 37, 2005.
- AUTOMEDICAÇÃO Revista da Associação Médica Brasileira, v. 47, n.4, p. 269-270, 2001. Disponível em www.scielo.br/scielo.php. Acesso em 08 de junho de 2009.
- BABICZ, I.; RICHETTI, A.; ALMEIDA, C. L.; CANSIAN, R.; EMMERICH, J. D.; PAROUL, N. Estudo da composição química e avaliação de atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir de *Echinodorus macrophyllus*. XXIX reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, de 19 a 22 de maio de 2006, Água de Lindóia, SP. **Anais da XXIX reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, de 19 a 22 de maio de 2006, Água de Lindóia, SP.
- BARINI, R.; COUTO, E.; RIBEIRO, S. T.; LEIBER, S. R.; BATISTA, S. C.; SILVA, J. L. P. “Abortamento Recorrente de Causa Imunológica: Avaliação de um Protocolo de Investigação e Tratamento”. **Rev. Bras.Gin.Obst.**, v. 20, n.2, p. 83–89, 1998.
- BARROS, W. M. de. **Efeito do extrato hidroetanólico dos rizomas da *Simaba ferruginea* ST Hil.(SIMAROUBACEAE), sobre o comportamento e reprodução de ratas da Linhagem Wistar**. 2007. 167f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. São Paulo, 2007.
- BAZER, F. N.; ROBERTS, R. M. Biochemical aspects of conceptus–endometrial interactions. **J. Exp. Zool.**, v. 228, p. 373-82, 1983.

- BERTAN, C. M.; BINELI, M.; MADUREIRA, E. H. TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 43, n.6, p.824-40, 2006.
- BEVILAQUA, G. A. P.; NEDEL, J. L.; ZUANAZZI, J. A.; CORREA, C. T. Distribuição geográfica e composição química do chapéu-de-couro (*Echinodorus* spp.) no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 213-218, 2001.
- BEVILAQUA, G.A.P.; SCHIEDECK, G. **A busca de novos medicamentos e a conservação de recursos genéticos de plantas medicinais**. 2007. Artigo em Hypertexto. http://www.infobibos.com/Artigos/2007_4/medicinais/index.htm>. Acesso em 14/2/2010.
- BIGGER, J. D.; BORLAND, R. M. Physiological aspects of growth and development of the pre-implantation mammalian embryo. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 38, p. 95-119, 1976.
- BOTSARIS, A.S. **Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras**. São Paulo: Editora Cone LTDA, 1995.
- BRITO, F. A.; SAMPAIO, A. L. F., PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A.; HENRIQUES, M. G. M. O. Inibição por extratos de *Echinodorus grandiflorus* do edema de pata induzido pelo composto 48/80, histamina e serotonina. In: **REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL**, Caxambu, MG, **FESBE - 99** Caxambu, MG, 1999. p. 391.
- BRUGIOLO, A. S. S. **Avaliação do efeito do extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus* na modulação da resposta imune no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA**. 2010. 90f. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Imunologia. UFJF, Juiz de Fora, MG.
- CAILLEAUX, S. R.; PIMENTA, D. S.; ARAÚJO, C. V.; FIGUEIREDO, M. R.; TIBIRIÇÁ, E. Investigação dos efeitos vasodilatadores de extratos brutos de *Echinodorus grandiflorus* no rim isolado e perfundido de coelho. In: XVI LATINOAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 2000, Águas de Lindóia, SP. **Anais do XVI Latinoamerican Congress of Pharmacology**, Águas de Lindóia, SP, 2000. p. 226.
- CALLIARI-MARTIN, M. R.; Dietrich, S.; Bortolini, C. E. et al. (2001). Embriotoxicidade da *Artemisia vulgaris* Linné em ratas. **Rev Medica HSVP**, v.11, n. 28, p. 12-17.
- CALUWERTS, S.; PIJNENBORG, R.; LUYTEN, C. et al. Effects of interleukin 11 (IL-11) on early post-implantation development of the rat. **Cytokine**, v. 12, n. 6, p. 797-800, 2000.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CARDOSO, G.L.C.; PEREIRA, N. A.; LAINETTI, R. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de (*Echinodorus grandiflorus*, [Cham. E Schl.] Mitch., Alismataceae). **Rev. Bras. Farm.**, v. 84, n. 1, p. 5-7, 2003.

- CARDOSO, G. L. C.; PEREIRA, N. A.; LAINETTI, R. Avaliação da atividade do chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) (Cham. & Schl.) Mitch. (Alismataceae) sobre os níveis plasmáticos de colesterol em camundongos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 86, n. 3, p. 95-96, 2005.
- CARSON, G. D.; NAFTOLIN, F. Fertilization and pre-implantation development. **La Vie médicale au Canada Français**, v. 11, p. 216-225, 1982.
- CHAHOUD, I., A. LIGENSA, *et al.* "Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects". **Reprod. Toxicol.**, vol.13, n.5, p.375-81, 1999.
- CHRISTIAN, M. S. **Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology**, p. 1301-1381. In: W. HAYNES. Principles and Methods of Toxicology. 4.ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001.
- CLEMETSON, C. A. B.; MOSHFEGHI, M. M.; MALLIKARJUNESWARA, V. R. The surface charge on the five- day rat blastocyst. In: BLANDAU, R. J. **The biology of the blastocyst**. Chicago: The University of Chicago Press. 1971, p. 193-205.
- COELHO, A. A. M.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. S. Atividade larvicida de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Díptera, Culicidae), em condições de laboratório. **BioAssay**, v. 4, n. 3, p.1-6, 2009.
- COIMBRA, R. **Manual de Fitoterapia**. 2. ed. Belém: CEJUP, 1994.
- CONFINO, E.; RAWLINS, R.; BINOR, Z. et al. The effect of the oviduct, uterine, and in vitro environments on zona thinning in the mouse embryo. **Fertil. Steril.**, v. 68, n. 1, p. 164-7, 1997.
- CORRÊA JÚNIOR, C., MING, L. C E SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: EMATER/PR, 1994.
- CORRÊA, P. M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.
- COSTA, M.; TANAKA, C. M. A.; IMAMURA, P. M.; MARSAIOLI, A. J. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 117-122. 1999.
- CROXATTO, H. B. *et al.* Hormonal control of ovum transport through the rat oviduct. **Arch. Biol. Med. Grap.**, v. 24, p. 403-410, 1991.
- DE LUCA, R. L. **Padronização genética e cultivo controlado de *Echinodorus grandiflorus* Micheli para produção de fitoterápicos**. 2003. 157p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- DI STASI, L. C; HIRUMA-LIMA, C. **As Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo, Editora UNESP, 2002.
- DONÁDIO, M. V. F. **Estudo do estresse agudo e a participação do sistema angiotensinérgico sobre a função reprodutiva em ratas: comportamento sexual,**

ovulação e lactação. 2005. 137f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DUARTE, D. F. Uma breve historia do ópio e dos opióides. In **Rev. Bras Anesthesiol**, v.55, n. 1, p. 135-146, 2005.

DUARTE, M. G. R.; SOARES, I. A. A.; BRANDÃO, M.; JÁCOME, R. L. R. P.; FERREIRA, M. D.; SILVA, C. R. F.; OLIVEIRA, A. B. Phytochemical and antibacterial screening of Brazilian weed plants. 2º IUPAC INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIODIVERSITY, 1999, Belo Horizonte. **Livro de Resumos da 2º Iupac International Conference on Biodiversity**, Belo Horizonte, 1999. p. 188- 95.

DUARTE, M. G. R.; SOARES, I. A. A.; BRANDÃO, M.; JÁCOME, R. L. R. P.; FERREIRA, M. D. ; SILVA, C. R. F. ; OLIVEIRA, A. B. Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana *in vitro* de plantas invasoras. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v.20, n.2, p.177-182, 2002.

DUMM. C. L. A. G. **Primeira semana do desenvolvimento. Segmentação e implantação.** In: DUM, C. G. Embriologia Humana – atlas e texto. Paulo, A. F. D. (Trad) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

DUTRA, R. C.; TAVARES, C. Z; FERRAZ, S. O.; SOUSA, O. V. PIMENTA, D. S. Investigação das atividades analgésiva e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.16, n. 4, p. 469-474, 2006.

ENDERS, A. C. Mechanisms of implantation of the blastocyst. In: VELARDO, J. T., KASPROW, B. A. **Biology of reproduction: basic and clinical studies.** New Orleans: Pan American Association of Anatomy. 1972. p. 313-333.

ESPEY L. L. “Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis”. **Biol. Reprod.** v. 22, n.1, p. 73-106, 1980.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL.1926. 1ª Ed. Companhia Editora Nacional, São Paulo.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL.1959. São Paulo, Indústria Gráfica Siqueira.

FAZLEABAS, A. T.; VERHAGE, H. G. Embryos maternal dialogue in the primate: regulation of insulin-growth binding protein (IGFBP-1). **Arch. Biol. Med. Exp.**, v. 24, p. 311-15, 1991.

FERNANDES, A. L. S.; OLIVEIRA, V. S. C.; TANAKA, C. M. A. Estudo químico de *Echinodorus macrophyllus* (ALISMATACEAE). 2002. XI Encontro Anual de Iniciação Científica, de 1 a 4 de outubro de 2002, Maringá, PR. Universidade Estadual de Maringá, PR. **Anais do XI Encontro Anual de Iniciação Científica**, de 1 a 4 de outubro de 2002, Maringá, PR.

FINN, C. A. The implantation reaction. In: WYNN, R. M. **Biology of the uterus.** 1. ed. New York: Plenum Press, 1977.

FORCELLEDO, M. L.; CROXATTO, H. B. Effects of 4-hydroxyandros-tenedione and exogenous testosterone on blood concentration of oestradiol and oviductal embryo transport in the rat. **J. Endocrinol.**, v. 118, p. 93-100, 1988.

GAGIOTI, S.; SACAVONE, C.; BEVILACQUA, E. Participation of the mouse implanting trophoblastic in nitric oxide production during pregnancy. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 260-8, 2000.

GALVÁN, A. J.; O'CONNOR, H.; VALBUENA, D. et al. The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. **Biol. Reprod.**, v.62, p. 430-9, 2000.

GIBALDI, D.; PIMENTA, D. S.; SOARES, R. O. A.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; BOZZA, M. T.; HENRIQUES, M. G. M. O.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Trypanocidal activity of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schldl.) Micheli - Alismataceae. In: **XXVIII ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGAS DISEASE & XVII ANNUAL MEETING OF BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGY**, 2001, Caxambú, MG. **Livro de resumos**, p. 91.

GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Como um mamífero se desenvolve desde a fertilização até a implantação do blastocisto. **Bol. CBR., UFJF**, v. 18, p. 15-32, 1999.

GUERRA, M.; MAZONI, A. S.; BRANDÃO, M. A. et al. Toxicology of lapachol in rats: embryolethality. **Rev. Bras. Biol.**, v. 61, p. 171-174, 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. In: *Female Physiology Before Pregnancy and Female Hormones*. **Medical Physiology**, 11 ed. Guyton & Hall eds. 2009.

HAYNES, R. R.; HOLM-NIELSEN, L. B. **The Alismataceae**. Monografia. **Flora Neotropica**. New York Botanical Garden, N.Y. 1994.

HALDER, J. B., ZHAO, X., SOKER, S., PARIJA, B. C., KLAGSBRUN, M., DAS, S. K., and DEY, S. K. "Differential expression of VEGF isoforms and VEGF (164)-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF(164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation". **Genesis**, v. 26, p. 213–224, 2000.

HARPER, M. J. K. **Ganete and zygote transport**. In: **KNOBIL, E. & NEILL, J. D.** The physiology of reproduction **2. ed.** New York: **Raven Press**, 1994.

HARPER, M. J. K.; NORRIS, C. J.; RAJKUMAR, K. Prostaglandin release by zygotes and endometria of pregnant rabbits. **Biol. Reprod.**, v. 28, p. 350-62, 1983.

HEAP, R. B.; FLINT, A. P. F.; GASDBY, J. E. Embryonic signals that establish pregnancy. **Br. Med. Bull.**, v. 34, p. 129-135, 1979.

HERRLER, A.; KRUSCHE, C. A.; BEIER, H. M. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 1302-10, 1998.

HOLSON J. F; NEMEC M. D; STUMP D. G; KAUFMAN, L. E; LINDSTRÖM, P; VARSHO, B. J. **Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study finding.** In: Hood RD, editor. *Developmental and reproductive toxicology - a practical approach*. 2.ed. Londres: Taylor & Francis, 2006.

HOOD, R. D. (ed) **Developmental and reproductive toxicology – a practical approach**. 2. ed. Taylor & Francis: Londres, 2006.

HUET, H.; ANDREWS, G. K.; DEY, S. K. Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. **Endocrinol.**, v. 125, n.3, p.1683-90, 1989.

ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). ICH Harmonized Tripartite Guideline S5(R2): detection of toxicity to reproduction for medical products and toxicity for male fertility; 2005.

ILLIIGWORTH, I. M.; KISZKA, I.; BAGLEY, S. et al. Desmosomes are reduced in the mouse uterine luminal epithelium during the preimplantation period of pregnancy: a mechanism for facilitation of implantation. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 1764-73, 2000.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 847-856, 2000.

KINOSHITA, K. et al. Involvement of prostaglandins in the pregnant mouse. In: HAYAISHI, O.; YAMAMOTO, S. *Advances in Prostaglandins, tromboxane and leukotriene research*, v. 15, **New York: Raven Press**, 1985, p.605-7.

KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Review Press, 1994.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H.; SHIMAMOTO, S; OHSAKI, A. Chapecoderins A-C, new labdane-derived diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 3, p. 375-377. 2000a.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. Echinophyllins A and B, novel nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Tetrahedron Letters**, v. 41, n. 16, p. 2939-2943. 2000b.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. Chapecoderins A-C, new labdane-derived diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **J. Nat. Prod.**, v.63, n.3, p. 375- 377, 2000c.

KOBAYASHI, M., HIRAKO, M. *et al.* Rat hepatoma reuber H-35 cells produce factors that promote the hatching of mouse embryos cultured in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 1041-1049, 1997.

LAURINCK, J. *et al.* Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in preimplantation bovine embryos produced in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 1024-1032, 2000.

LEHTONEN, S. An integrative approach to species delimitation in *Echinodorus* (Alismataceae) and the description of two new species. **Kew Bulletin**, 63: 525–563 (2008).

LEITE, J. P. V. **Contribuição ao estudo farmacognóstico do *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Mich. (Chapéu-de-couro)**. 1995. 86f. Monografia (Especialização - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.

LEITE, J. P.V.; PIMENTA, D. S.; GOMES, R. S. D. L.; DANTAS-BARROS, A. M. Contribuição ao estudo farmacobotânico de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Chapéu-de-couro) – Alismataceae. **Rev. Bras.Farmacog.**, v.17, n.2, p.1-6, 2007.

LEITE, S. N.; FLORIANI, A. E.; BIAVATTI, M. W. ; CECHINED, F. V. Parâmetros fitoquímicos, físico-químicos e anatômicos para o Controle de qualidade do chapéu decouro (*E. grandiflorus x macrophyllus*, Alismatacea). **Resumos do X Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais do Brasil, 1998**. Águas de Lindóia, S.P.

LESSA, M. A.; ARAÚJO, C. V.; KAPLAN, M. A.; FIGUEIREDO, M. R.; TIBIRIÇÁ, E. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. **Fundam. Clin. Pharmacol.** v.22, n. 2, p. 161-168, 2008.

LIM, K. J. H.; ODUKOYA, O. O. A.; AJJAN, R. A. et al. The role of T-helpes cytokines in human reproduction . **Fertil Steril**, v. 73: 136-42, 2000.

LIMA, E. da C. **Análise química e genotóxica de *Echinodorus grandiflorus*: suporte biotecnológico na preparação farmacêutica de extratos vegetais seguros para uso medicinal**. 2006. 124f.Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

LOPES, L. C.; ALBANO, F.; LARANJA, G. A. T.; ALVES, L. M. SILVA, L. F. M.; SOUZA, I. M. A.; NOGUEIRA-NETO, I. F.; KOVARY, K. “Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves”. **Toxicol. Letters**, v. 116: p. 189-198, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum LTDA, 2002.

MANS, D.; HARTMANN, R. Echinodol: a new cembrane derivate from *Echinodorus grandiflorus*. **Planta Médica**, v. 59, n.5, p. 465-466, 1993.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C. **Plantas medicinais**. Viçosa: Ed. Universitária-UFV, 1994.

MATIAS, L. Q. O gênero *Echinodorus* (Alismatacea) no domínio da caatinga brasileira. **Rodriguesia**, v. 58, n. 4, p. 743-774. 2007.

MATOS, C. S.; BURLINI, L. S.; PIMENTA, D.; FIGUEIREDO, M. R. & TIBIRIÇA, E. Estudo dos Mecanismos de Ação Envolvidos no Efeito anti-hipertensivo de Extratos Brutos de *Echinodorus grandiflorus*. In: XVI LATINOAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 2000, Águas de Lindóia/SP. **XVI Latinoamerican Congress of Pharmacology**, Águas de Lindóia/SP, 2000. p. 222.

- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. Ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.
- MENDONÇA, M.; MOTTA, M. L. Formação e histofisiologia da placenta. In: BEDRAN, J. N. **O uso de drogas na gravidez e na lactação**. Rio de Janeiro: Guanabara. Cap.1, p. 3-13, 1988.
- MICHELON, T.; SILVEIRA, J. G.; GRAUDENZ, M.; NEUMANN, J. Imunologia na gestação; **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 50, n. 2. p. 145-151, 2006.
- MOLEY, K. H. Diabetes and preimplantation events of embryogenesis. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v. 17, n. 2, p.137-151, 1999.
- MOORE, G. D.; CROXATTO, H. B. Effects of delayed treatment with estrogen on the transport of microspheres by the rat oviduct. **J. Reprod. Fertil.**, v. 83, p. 795-802, 1988.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2000.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008.
- MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Inc. Algonac, Michigan. 2000.
- NALBANDOV, A. V. Endocrine control of implantation. In: BLANDAU, R. J. **The biology of the blastocyst**. Chicago: The University of Chicago Press. 1971.
- O'RAHILLY, R. & MULLER, F. **Embriologia e Teratologia Humanas**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.
- PAKRASI, P. L.; DEY, S. K. Blastocyst is the source of prostaglandins in the implantation site in the rabbit. **Prostaglandis**, v. 24, n. 1, p. 73-7, 1982.
- PARKER, R. M. Testing for reproductive toxicity. In: Hood, R. D. (ed) **Developmental and reproductive toxicology – a practical approach**. 2. ed. Taylor & Francis: Londres, 2006.
- PARR, M. B.; PARR, E. L. The implantation reaction. In: WYNN, R. M. & JOLLIE, W. P. **Biology of the uterus**. 2 ed. New York: Plenum Medical Book Company. 1989.
- PIMENTA, D. S. **Contribuição ao cultivo, ecologia e validação do uso de *Echinodorus grandiflorus* (Chamisso & Schlechtendal) Micheli (Chapéu de couro)**. 2002. 179f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
- PIMENTA, D. S. **Coletânea científica de plantas de uso medicinal**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005.
- PIMENTA, D. S.; AMARAL, A. C. F.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Padronização de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli . I- Interface de perfis cromatográficos obtidos por CG-EM e CLAE-UV de extratos apolares e polares de folhas. In:

XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2002, Cuiabá, MT. **Resumo do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Cuiabá, MT, 2002a.

PIMENTA, D. S.; AMARAL, A. C. F.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Padronização de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) (Micheli) . II- Análise por CLAE-UV de extratos aquosos e etanólicos de folhas coletadas sazonalmente. In: XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2002, Cuiabá, MT. **Resumo do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Cuiabá, MT, 2002b.

PIMENTA, D. S.; BARROS, Z. A.; TIBIRIÇÁ, E.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Investigação da atividade hipotensora de extratos brutos de *Echinodorus grandiflorus* (Chamisso e Schlechtendal) Micheli - Chapéu-de-couro. **I Bienal de pesquisa da FIOCRUZ/RJ**. 1998a.

PIMENTA, D. S.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R. O. A.; GIBALDI, D.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Avaliação de atividade tripanosomicida “*in vitro*” de *Echinodorus macrophyllus* (KUNTH) MICH. (chapéu-de-couro). In: XV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1998, Águas de Lindóia. **Livro de Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Águas de Lindóia, 1998b.

PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 78, n.4, p. 623-628, 2006.

PINTO A. C, REGO G. C, SIQUEIRA A. M, CARDOSO C. C, REIS P. A, MARQUES E. A COELHO M. G, DE CARVALHO SABINO, K. C. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.*, v.111, n. 2, p. 435-439, 2007.

POLACCHINE, B. S. **Avaliação do efeito anti-hipertensivo de *Echinodorus grandiflorus* em hipertensão experimental renovascular 1R-1C e 2R-1C**. 2005. 58f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2005.

POLACCHINE, B. S.; LOLLATO, G.; FRANCIOSI, A. C.; NAME, C. F. Atividade anti-hipertensiva do extrato aquoso bruto de *Echinodorus grandiflorus* em ratos com hipertensão renovascular 2R-1C e 1R-1C. **Jornada Internacional de Plantas Medicinais**, 2006, Joinville - SC.

PORTELA, V. G.; DINIZ, L.; VIEIRA, M.; Efeito do *Echinodorus macrophyllus* sobre a função renal de ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina. XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE, 2007. Águas de Lindóia, SP. **Anais da XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE**, 2007. Águas de Lindóia, SP.

PSYCHOYOS, A. Recent researches on egg implantation. *Ciba Foundation Study*, 23, p.4, Churchill, London, 1966.

QUINN, C. E.; CASPES, R. F. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 2, p. 229-236. 2009.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RIBEIRO, R. A.; MELO, M. M. R. F.; BARROS, F.; GOMES, C.; TROLIN, G. Acute antihypertensive effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo. **J. Ethnopharmacol.**, v. 15, p. 261- 269, 1986.

RIBEIRO, R. A.; BARROS, F.; MELO, M. M. R. F.; CHIEIA, S.; WANDERLEY, M. G.; GOMES, C.; TROLIN, G. Acute diuretic effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo, Brasil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 24, p. 19-29, 1988.

RONDEROS, J. R. Fecundação. In: DUMM, C. G. **Embriologia Humana**. Atlas e texto. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006.

ROCHA, C. G.; RESENDE, U. M.; LUGNANI, J. S. Diversidade de macrófitas em ambientes quátricos do IPPAN na Fazenda Santa Emília, Aquidauana, MS. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 456-458, 2007.

ROSSI-FERRAGUT, L. M., ROCHA, C. C. *et al.* Entendendo o processo de fertilização...(da capacitação espermática até a fusão entre as membranas plasmáticas) Parte I. **J. Brás. Reprod. Assist.**, v. 5, n.1, p. 30-34, 2001.

SADLER, T. W. **Langman Embriologia Médica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

SARTOR, P.; DULUC, A. J. Physiologie animale. Déroulement dès premiers stades de l'ovoimplantation chez des rattes castrées le 5^{ème} jour de la gésation avant midi. **C. R. Acad. Sc. Paris**, n. 290, p. 481-4, 1980.

SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In Simiões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G.; De Mello, J. C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds) Farmacognosia – da planta ao medicamento, Florianópolis, Editora da UFRGS/UFSC, 2002.

SCHLAFKE, S.; ENDERS, A. C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biology Reproduction*, v. 12, p. 41-64, 1977 apud FINN, C. A. The implantation reaction. In: WYNN, R. M. **Biology of the uterus**. 1ed. New York: Plenum Press, 1977. p.245-308.

SCHNITZLER, M.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavon-C-glycosides and Tartaric Acid derivatives from the Brazilian Medicinal Plant *Echinodorus grandiflorus* ssp. *aureus*. In: DPhG JAHRESTAGUNG AND JOINT MEETING, 2004, Münster.

SCHNITZLER, M.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Trans-aconic acid, glucosylflavones and hydroxycinnamoyltartaric acid form the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. *aureus*, a Brazilian medicinal plant. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 17, n.2, p.149-154, 2007.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 2002. RESOLUÇÃO SES/RJ nº 1757. D.O. do Estado do Rio de Janeiro, de 18 de fevereiro de 2002. Contra-indica o uso de plantas medicinais no âmbito do Estado do Rio de Janeiro e dá outras providências.

SENGUPTA, J.; ROY, S. K.; MANCHANDA, S. K. Effect of an anti-oestrogen on implantation of mouse blastocysts. **J. Reprod. Fertil.**, v. 62, p. 433-6, 1981.

SHEPARD, T. H. **Catalog of teratogenic agents**. London: Johns Hopkins University Press, 1980.

SHIGEMORI, H.; SHIMAMOTO, S.; SEKIGUCHI, M.; OHSAKI, A.; KOBAYASHI, J. Echinodolides A and B, New Cembrane Diterpenoids with an Eight-Membered Lactone Ring from the Leaves of *Echinodorus macrophyllus*. (2002). **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 82-84.

SILVA C.J., BASTOS J.K., TAKAHASHI C.S. (2010). Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. **J. Ethnopharmacol.** v.127, p. 445-450.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 1998.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª ed. Editora UFRGS, 2004.

SINGH, M. M. et al. Antigestagenic activity of *Ixora finlaysoniana* in rat **Contraception**, 48, p. 179-189, 1993.

SMITH, J. V.; LUO, Y. "Studies on molecular mechanism of *G. biloba* extracts". **Applied Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, n. 4, p. 465-472, 2004.

SOUZA, E. R.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Desenvolvimento de pré-embrião de ratas Wistar da Colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF. **Bol. Cent. Biol. Reprod.UFJF**, v. 16, p. 63-70, 1997.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

SPANOS, S; BECKER, D. L.; WINSTON, R. M. L. et al. Apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human implantation embryo development. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 1413-20, 2000.

STEWART, C L.; KASPAR, P; BRUNET, L J. et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. **Nature**, v. 39, n. 3, p. 76-9, 1992.

STRAUSS III, J.; COUTIFARIS, C. The endometrium and myometrium: regulation and dysfunction. In: YEN, S. S. C; JAFFE, R. B.; BARBIERI, R. L. **Reproductive**

Endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999.

STROWITZKI, T.; GERMEYER, A.; POPOVICI, R ; WOLFF, M. von. The human endometrium as a fertility-determining factor. **Human Reproductive Update**, v. 22, n.5, p. 617-630, 2006.

STUTZ, C. M.; SOARES, R. O. A.; FERNANDES-FERREIRA, E.; PIMENTA, D. S.; GIBALDI, D.; BOZZA, M. Trypanosomicidal activity of *Echinodorus grandiflorus* (Chamisso & Schlechtendal) (Micheli). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, Supl. II, 1999.

TANAKA, C. M. A. **Constituintes químicos de cinco espécies de *Echinodorus* e avaliação do β -pineno como substrato para obtenção de quírons mais elaborados.** 2000. 298p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

TANAKA, C. M. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; MARSAIOLI, A. J. Cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytoch.**, v. 44, n. 8, p. 1547-1549, 1997.

TIBIRIÇÁ, E.; ALMEIDA, A. L. F.; CAILLEAUX, S.; PIMENTA, D. S.; KAPLAN, M.A.; LESSA, M. A.; FIGUEIREDO, M. R. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilatador effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. **J. Ethnopharmacol.** v.111, p. 50-55, 2007.

TONG, T. Y. Y.; GOH, V. H. H. *et al.* Direct effects of varying doses of oestradiol on early embryonic development in in vitro culture of rat's two-cell embryos. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 78, p. 453-456, 2000.

TSAI, H-D; CHANG, C-C; HSIEH, Y-Y *et al.* Recombinant human leukemia inhibitory factor enhances the development of preimplantation mouse embryo in vitro. **Fertil. Steril.**, v.71, n. 4, p.722-5, 1999.

VEENSTRA VAN NIEUWENHOVEN, A. L., HEINEMAN, M. J and FAAS, M. M. The immunology of successful pregnancy. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 4, p. 347-357, 2003.

VIGGIANO, M.; CEBRAL, E.; GIMENO, A. L.; GIMENO, M. F. Probable influence of ova and embryo prostaglandins in the differential transport in pregnant and cycling rats. **Prostaglandins Leukot Essent. Fatty Acid.**, v. 45, p. 211-215, 1992.

VINIJSAMUN, *et al.* Effects of monoclonal antibody agst progesterone on embryo transport, development and implantation in laboratory mice. **Reprod. Fertil. Develop.** v.2, p. 395-405, 1990.

WEITLAUF, H. M. Biology implantation In. KNOBIL, E. & NEILL, J. D. **The physiology of reproduction.** 2 ed. New York: Review Press, 1994.

YEN, S.C.; JAFFE, R.B.; BARBIERI, R.L. **Reproductive endocrinology: physiology and clinical management.** 4. ed. London: W.B. Saunders, 1999.

YUNES, J. B.; CALIXTO, R. A. **Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó-SC: Argus, 2001.

YOUNG, S. L.; LESSEY, B. A. Progesterone Function in Human Endometrium: Clinical Perspectives. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.28, n.1, p. 5-16, 2010.

APÊNDICE A
CAPÍTULO DE LIVRO

In: Medicinal Plants Classification, Biosynthesis...
Editor: Alejandro Varela and Jasiah Ibañez

ISBN: 978-1-60876-027-5
© 2007 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 9

Ethnobotany and Experimental Pharmacology of *Echinodorus Grandiflorus* (chapéu de couro)

Sônia Sin Singer Brugiolo, Luciana Valente Borges^{}, Daniel Sales Pimenta, Alessa Sin Singer Brugiolo, Vera Maria Peters and Martha de Oliveira Guerra*

Professors/Researchers from Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil.

Abstract

Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schldl.) Micheli and *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli, are monocotyledonous species belonging to Alismataceae family. These plants are aquatic or semi-aquatic herbs, with submersed, floating or emersed leaves and with inflorescences that remain flourished during nearly 30 days. In Brazil, they are popularly known as "chapéu de couro" and have been used in the folk medicine in the treatment of several disorders. Its leaves are resources for very common teas, used as diuretic and anti-inflammatory, blood depurative, against arthritis and skin diseases, liver maladies and renal affections, as well as against amygdalitis, pharyngitis, stomatitis and gingivitis. Several researches have suggested promising results on medicinal activities of "chapéu de couro". Some of those activities were observed in vivo, such as diuretic, anti-inflammatory, hypotensive and antihypertensive, antimicrobial, decholesterolizing, immunosuppressive and vasodilator. In vitro activities were also confirmed, such as trypanocidal, leishmanicidal and antineoplastic. In this work it is presented the ethno and experimental pharmacology, regarding the researches accomplished so far, besides the botanical characterization, geographic distribution, macro and microscopic description, chemical constituents and toxicology.

* Corresponding author: Rua Orestes Fabiano Alves, 21/201 São Pedro, CEP: 36037-120 Juiz de Fora, MG Brazil, email: luvalenteb@yahoo.com.br

Keywords: Alismataceae, *Echinodorus*, chapéu de couro.

General Considerations

Echinodorus grandiflorus (Cham. and Schlttdl.) Micheli belongs to the family Alismataceae which gathers aquatic or semi-aquatic herbaceous plants with leaves submerged, flotation or emergent that can be recognized by the production of latex, basal placentation and fruits of the type achene.

Each inflorescence stays flowery for approximately 30 days and it produces about 220 flowers, being stood out above the leaves during the whole spring. The flowers are scentless, actinomorphic, shallow and they possess white corolla with numerous stamens and yellow pistils, exposed. The anthesis of the flowers happens in the morning and each flower lasts about eight hours. Their morphologic type allows the access of several insects. The visits of 21 species of bees were verified and of six species of beetles, being the bees the main pollinators (HAYNES and NIELSEN, 1994, VIEIRA and LIMA, 1997). The aspect of the leaves and of the inflorescence with flowers in anthesis of *E. grandiflorus* can be observed in the illustrations 1 and 2.

Echinodorus spp. has unisexual flowers and cylindrical fruits containing glands among ribs. *E. grandiflorus* ssp. *grandiflorus* holds more than 21 stamens, leaves have pellucid markings as dots or lines, petioles are at least five times larger than the sepals, and bracts are larger than the petioles.



Figure 1. *Echinodorus grandiflorus*: general aspect of leaves.
Photo: PIMENTA, D.S.



Figure 2. *Echinodorus grandiflorus*: general aspect of inflorescence holding flowers in anthesis. Photo: PIMENTA, D.S.

E. grandiflorus is popularly known as “chá-mineiro”, “erva-de-pântano”, “erva-de-bugre”, “congonha-do-brejo”, “erva-do-brejo”, “chá de campanha”, and, most commonly, “chapéu de couro” (CORRÊA, 1984, CORRÊA JÚNIOR *et al.*, 1994, MARTINS *et al.*, 1994, LEITE, 1995).

Geographical Distribution

Alismataceae consists of 11 aquatic and semi-aquatic genera and about 75 species. *Echinodorus* and *Sagittaria* are among the largest genera in the family, each with 26 and 25 species, respectively. Other genera consist of less than 10 species each (TANAKA, 2000). The genus *Echinodorus* occurs in USA to Argentina and is restricted to the western hemisphere (BEVILAQUA *et al.*, 2001). According to Joly (1991), *Echinodorus* has its center of dispersion in Tropical America.

Haynes and Nielsen (1994) recorded the following species: *E. grandiflorus* ssp. *grandiflorus* (center-west, southeast and south of Brazil, Paraguay, north of Argentina and Uruguay, flowering and fruiting from October to May), *E. grandiflorus* ssp. *aureus* (Cuba, Mexico, Central America, Colombia, Venezuela and Brazil, flowering and fruiting year round), *E. macrophyllus* ssp. *macrophyllus* (Guyana, western Brazil and Bolivia, flowering from October to April) and *E. macrophyllus* ssp. *scaber* (southern Nicaragua, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, southern Bolivia, Paraguay and Brazil, flowering and fruiting year round).

Macroscopic Description

E. grandiflorus is an aquatic plant with rhizome and emerged, perennial leaves that bear petioles. Base of leaf cordate, lobe ovate and apex of leaf ranging from sharp pointed to acuminate. Margin of leaf entire, leaf blade dark green in color, about 20 to 40cm length vs 15 to 35cm basal width, wrinkled surface, rough, 11 to 13 salient veins in the abaxial surface. Petiole long, coriaceous, measuring up to 1,5m length (depending on the environment), longitudinally channeled and provided with longitudinal ridges. It is probably the coriaceous aspect of the leaf blade that has given the plant the popular name of “chapéu de couro”. When present, inflorescences have taxonomic value and, in the case of *E. grandiflorus*, they are panicles, which may have a single or many branches, as well as either small basal internodes or successive pseudoverticillate (HAYNES and NIELSEN, 1994).

Microscopic Description

Transverse cuts of the limb to foliate they demonstrate the presence of mesophyll of the type dorsiventral, with a layer of parenchyma differentiated palisade and from six to eight layers of spongy parenchyma. Canals secretory of latex were observed in the petioles and in the main ribs as well as secretory cavities of latex for the whole limb (PIMENTA, 2002). The collenchyma tissue is restricted to the medium rib, possessing in this species two to three layers (SCREMIN-DAYS *et al.*, 2002). The anatomy of *E. grandiflorus* is clearly adapted to the aquatic atmosphere and specifically of emergent aquatic species. Besides the numerous constituent chambers of aerenchymas, from the root cortex, going by the petiole and constituting part of the main ribs of the limb to foliate, the species presents numerous diaphragms delimiting those chambers internally (SCREMIN-DAYS, 2000).

In the secretory structures observed in leaves, the epithelium is simple, delimiting the channels or cavities and such structures don't get to characterize laticifers, that would be more complex structures of secretion and of deposition of latex. According to Bona *et al.* (2004), the petiole of *E. grandiflorus* presents epidermis uniseriate with cells containing walls periclinal external curves and thin cuticle. The fundamental tissue can be divided in three areas: a chlorophyllian parenchyma in the furrows of the petiole; a colorless parenchyma in the projections of the furrow, containing grains of starch and monocrystals and the aerenchyma with chambers surrounded by 16 to 25 cells. Those air cavities are obliquely divided lightly by diaphragms oblique constituted by a layer of parenchyma cells, the ones which, interlinked, they form triangular small intercellular spaces. The vascular bundles are collateral, being located in the periphery of the circumference, without protochylema gap and disposed in arch in the aerenchyma, with protochylema gap. Schizogenetic laticiferous conducts are present in the parenchyma among the gaps of air and, in larger amount, about of the whole circumference of the petiole. Pimenta (2002) correlated the larger concentration of latex in the periphery of the petioles with its chemical characteristics and defense physicochemical. The latex has a fraction that is water soluble and another fraction that is water insoluble, this way, the insoluble fraction could be aiding to seal the epidermis against possible offenses, as well as precipitating in the small intracellular spaces of diaphragms

impeding the invasion of the air cavities of the aerenchyma for the water. The soluble fraction would be already related to the defense against herbivory in the submerged portion of the petioles.

Chemical Constituents

They were identified in the leaves of *E. grandiflorus*:

- 1) FATTY ACIDS: linolenic acid and dodecanoic acid (TANAKA, 2000); palmitic acid (PIMENTA, 2002).
- 2) TERPENOIDS
Essential oils: linalool, dihydroedulan, trans-caryophyllene, *alpha* humulene, E-farnesene, *beta* selinene, *alpha* farnesene, *delta* cadinene, E-nerolidol, caryophyllene oxide, humulene epoxide, bisabolone, drimenol, neocembrene, echinoic acid, cembranoid, phytol (PIMENTA *et al.*, 2006).
Diterpenoids: echinodol (MANS and HARTMANN, 1993), echinoic acid (TANAKA *et al.*, 1997), phytol, hardwickic acid, (-) 15-etoxicleroda 3 acid, 13-dien-15,16-olide-18-óic, acid (-) - (16)-hidróxi-cleroda-3,13-dien-16,15-olide-18 - oic (COSTA *et al.*, 1999, TANAKA, 2000), acid (-) -15 hidroxicleroda-3,13 - dien-16,15-olide-18-oic, acid (-) -cleroda-3,13(16),14-trien-18-oic (TANAKA, 2000), chapecoderins A, B and C (KOBAYASHI *et al.*, 2000c), echinodolides A and B (SHIGEMORI *et al.*, 2002), solidagolactona-I (PIMENTA, 2002).
- 3) STEROIDS: 24-etilcolest-4-en-3,6-dion; 3 β -the- β -D-glicopiranosil sitosterol (TANAKA, 2000); campesterol, stigmasterol, sitosterol (PIMENTA, 2002).
- 4) FENOLIC ACIDS: acid caffeic, acid ferulic and acid isoferulic (PIMENTA, 2002).
- 5) FLAVONOIDS: isoorientin, swertisin and isovitexin (PIMENTA, 2002; SCHNITZLER *et al.*, 2004), swertiajaponin, and isoorientin-7,3'-dimetil-ether (SCHNITZLER *et al.*, 2004).
- 6) ALKALOIDS: echinofillins A, B, C, D, F (KOBAYASHI *et al.*, 2000^o; KOBAYASHI *et al.*, 2000b).
- 7) DERIVED OF THE TARTARIC ACID: acids caftaric, chicoric, cafeoil tartaric feruloil, 2-the-feruloil tartaric and tartaric di-feruloil (SCHNITZLER *et al.*, 2004).

Ethnopharmacology

The parts of *E. grandiflorus* used for the treatment of several illnesses they are the leaves and the rhizomes. The use of the leaves is mentioned in FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL (1926, 1959); in Coimbra (1994), Corrêa Júnior *et al.* (1994), Teske and Trentini (1995), Nogueira (2000), Almança and Carvalho (2003). The use of the rhizomes was mentioned by Corrêa (1984), Lorenzi and Matos (2002) and Dutra *et al.* (2006).

Actions diuretic and anti-inflammatory are described in FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL (1926, 1959).

The tea of the leaves is used as diuretic, depurative, against syphilis, diseases of the skin, diseases of the liver, renal disorders, tonsillitis, pharyngitis, stomatitis, gingivitis and besides interrupting the progress of the arteriosclerosis. In the treatment of rheumatic gout and neuropathic pain compresses are applied and to combat the prostatitis seat bath it is recommended with the tea. The rhizomes are used in cataplasms for hernias (LORENZI & MATOS, 2002; DUTRA *et al.*, 2006).

Experimental Pharmacology

Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities

The treatment of mice orally with the hexane, methanolic and aqueous extracts, obtained of dry leaves, inhibited the edema of paws (BRITO *et al.*, 1999), in the same way that the methanolic extract of the rhizomes. This last one had the anti-inflammatory activity appraised for the pleurisy induced by carrageenin, being observed decrease of the leukocyte migration (DUTRA *et al.*, 2006).

The aqueous extract of the leaves and the methanolic extract of the rhizomes of “chapéu de couro” inhibited the abdominal writhings induced by intraperitoneal administration of acetic acid in mice, evidencing antinociceptive and anti-inflammatory activity (CARDOSO *et al.*, 2003).

Diuretic Activity

Diuretic activity was demonstrated, in female rats treated with the ethanolic extract (50%) of leaves of “chapéu de couro” (RIBEIRO *et al.*, 1988) and in mice treated with the tea of the leaves, (CARDOSO *et al.*, 2003), not being observed the same result for the ethanolic extract (80%), also obtained of leaves, and for the fraction ethyl acetate (COSENZA *et al.*, 2008).

Hypotensive and Anti-hypertensive Activities

In mice naturally hypertensive, the hydroalcoholic extract of the leaves of “chapéu de couro” to 50% strongly reduced the blood pressure and also decreased the heart frequency (RIBEIRO *et al.*, 1986). The administration in growing doses of the ethanolic crude extract, intraperitoneally, induced a dose-dependent anti-hypertensive effect, with fall of the blood pressure, of the heart debit and of the systemic vascular resistance, not having significant alteration in the heart frequency (ARAÚJO *et al.*, 2001); similar results were observed by Lessa *et al.* (2008) with intraperitoneal, intravenous or chronic oral administration of the same extract, in the same experimental model, also showing reduction of the mean blood

pressure, which was parallel to the reduction of the cardiac debit and of the systemic vascular resistance.

In anesthetized normotensives animals, the aqueous and hexanic extracts of the leaves, administered intravenous, induced hypotensive effect reversible and dose-dependent (PIMENTA *et al.*, 1998a). Similar results were found with the same extracts in hypertensive mice, when it was verified sharp inhibition of the synthesis of nitric oxide and significant reduction of the blood pressure (BARROS *et al.*, 1999).

Polacchine (2005) evaluated the anti-hypertensive action using normotensive and hypertensive animals, treated intravenously with different doses of the aqueous crude extract, noticing reduction of the mean blood pressure and blockade of the action of the adrenaline.

Vasodilating Activity

In studies using as experimental model the isolated aorta of rabbits, relaxation of 60% was observed (ALMEIDA *et al.*, 2000) to 65% (ALMEIDA *et al.*, 2001), using the aqueous extract of leaves and of 81%, with the insoluble fraction in methanol, obtained starting from the extract aqueous liofilized (ALMEIDA, 2004).

Cailleaux *et al.* (2000), using the hexanic, methanolic, aqueous and ethanolic extracts of leaves, droughts or breezes, in isolated kidneys of rabbits, observed decrease, significant and dose-dependent, of the perfusion pressure, being the best result obtained for the aqueous extract. The aqueous extract seems to exercise its vasodilating activity through the mediation of activation of receptors of nitric oxide and PAF, not presenting signs of prostaglandins generation or activation of potassium channels, suggesting that the hypotensive effect of the extract would be due to a potent systemic vasodilator effect (TIBIRIÇA *et al.*, 2006).

Antimicrobial Activity

The aqueous extract presented activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (DUARTE *et al.*, 1999) and methanolic extract of the leaves against *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus* (SOUZA *et al.*, 2004).

In Vitro Trypanocidal Activity

Trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* were incubated with the lyophilized aqueous extract, obtained of dry leaves, causing 90% of mortality after incubation for 24 hours (PIMENTA *et al.*, 1998b). With the hexanic crude extract and with the partitions in butanol and ethyl acetate from the methanolic crude extract (GIBALDI *et al.*, 2001), the mortality of metacyclic trypomastigote forms was 100%.

Leishmanicide Activity

The hexanic, methanolic and aqueous crude extracts, obtained of leaves, and the fractions hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and aqueous residue obtained of the partitions of the methanolic extract were evaluated against *Leishmania major*'s promastigotes, in infected mice. The more apolar constituents evidenced activity, being the more effective the hexane extract and the hexane and dichloromethane fractions (PIMENTA, 2002).

Hypocolesterolemic Activity

Cardoso *et al.* (2005) evaluated the activity of the aqueous extract on the plasma levels of cholesterol in mice treated with the oily solution of cholesterol in comparison with control animals and they verified the reduction of 2% of the cholesterol in treated animals with the tea to 5%, and in normal animals, for which the tea was given to 2,5%.

In Vitro Antineoplastic Activity

Pimenta (2002) conducted a screening for pharmacological assessment of the ability to inhibit proliferation of tumor cells through *in vitro* tests, using the extracts of cultures of strains of tumor cells SP2/0 (myeloma of mouse), NEURO 2A (neuroblastoma of mouse), J774 (macrophages of mouse), LLC-MK2 (epithelial cells from kidney of monkey), Erlich carcinoma (sarcoma induced by metilcolantreno), BW (the mouse lymphoma) and P3653 (plasmacytoma of mice). The crude extracts (hexanic, methanolic and aqueous) and the partitions more apolar from the methanolic crude extract (dichloromethane and hexane fractions) were the most promising against neoplasia.

Toxicity

Most of the studies on toxicity of *Echinodorus* refer to *E. macrophyllus* that is not object of that chapter. The toxicity of *E. grandiflorus* was not still studied appropriately, having only two works in the literature.

In 2005, Polacchine evaluated the acute toxicity in mice, treated with the tea of the leaves of *Echinodorus grandiflorus* orally in the doses of 0,5, 1,0, 2,0 and 4,0g/kg of body weight, no deaths were recorded in 24 hours.

Brugiolo *et al.* (2008) evaluated the effect of the doses of 500 and 1000mg/kg of the lyophilized aqueous extract of *Echinodorus grandiflorus* administered orally on the hematological and biochemical parameters of female Wistar rats, treated during 14 days post-insemination, observing anemia in the two doses and leukocytosis and hypercholesterolemia in the dose of 1000mg/kg.

Conclusion

Although many researches with the several types of extracts of *E. grandiflorus* have demonstrated promising results for several pathologies, future researches are necessary to be determined the safe use of this phytotherapeutic, mainly in clinical level. However, those extracts have being much used by the Brazilian population due to its diuretic and hypotensive activity.

References

- Almança, CCJ; Carvalho, JCT. Formulário de Prescrição Fitoterápica. São Paulo: Editora Ateneu, 2003, 166p.
- Almeida, ALF; Pimenta, DS; Figueiredo, MR; Kaplan, MA; Efeito, C. Vasodilatador de Extratos Brutos de *Echinodorus grandiflorus* na aorta isolada de coelho. XVI LATINOAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 2000, Águas de Lindóia, SP. *Anais do XVI Latinoamerican Congress of Pharmacology*, Águas de Lindóia, 2000, p. 222.
- Almeida, ALF; Pimenta, DS; Figueiredo, MR; Tibiriçá, Efeito, E. Vasodilatador de Extratos de *Echinodorus grandiflorus* na aorta isolada de coelho. In: XVI REUNIÃO ANUAL DA FESBE, 2001, Caxambu, MG. *Resumos da XVI Reunião Anual da FeSBE*, Caxambú, MG, 2001, p. 425-426.
- Almeida, ALF. *Investigação do efeito vasodilatador e anti-hipertensivo do extrato bruto de Echinodorus grandiflorus (Chamisso & Schlechtendal) Micheli*. 2004. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- Araujo, CVD; Matos, CS; Pimenta, DS; Figueiredo, MR; Tibiriçá, Efeitos, E. Cardiovasculares do extrato bruto de *Echinodorus grandiflorus* em ratos hipertensos. In: XVI REUNIÃO ANUAL DA FESBE, 2001, Caxambu, MG. *Resumos da XVI Reunião Anual da FeSBE*, Caxambú, MG, 2001. p. 427.
- Barros, ZA; Pimenta, DS; Figueiredo, MR; Tibiriçá, Efeitos, E. hemodinâmicos do extrato bruto de *Echinodorus grandiflorus* em ratos normotensos e hipertensos. In: XIV REUNIÃO ANUAL DA FESBE, 1999, Caxambu, MG. *Resumos da XIV Reunião Anual da FeSBE*, Caxambú, MG, 1999. p. 202.
- Bevilaqua, GAP; Nedel, JL; Zuanazzi, JA; Correa, CT. Distribuição geográfica e composição química de chapéu de couro (*Echinodorus* spp.) no Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, Santa Maria, 2001, 31(2), 213-218.
- Bona, C; Boeger, MR; Santos, GO. *Guia ilustrado de anatomia vegetal*. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 2004, p. 26-27.
- Brito, FA; Sampaio, ALF; Pimenta, DS; Figueiredo, MR; Kaplan, MA; Henriques, MGM. O. Inibição por extratos de *Echinodorus grandiflorus* do edema de pata induzido pelo composto 48/80, histamina e serotonina. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Caxambu, MG., FESBE 99 Caxambu, MG, 1999, p. 391.

- Brugiolo, SSS; Peters, VM; Pimenta, DS; Guerra, MO. Toxicidade do extrato aquoso liofilizado de chapéu de couro (*E. grandiflorus*) em ratos prenhes. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Águas de Lindóia, SP, FeSBE 2008, Águas de Lindóia, SP, *Livro de Resumos*, p.80.
- Cailleaux, SR; Pimenta, DS; Araujo, CV; Figueiredo, MR; Tibiriçá, E. Investigação dos efeitos vasodilatadores de extratos brutos de *Echinodorus grandiflorus* no rim isolado e perfundido de coelho. In: XVI LATINOAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 2000, Águas de Lindóia, SP. *Anais do XVI Latinoamerican Congress of Pharmacology*, Águas de Lindóia, SP, 2000, Pág. 226.
- Cardoso, GLC; Pereira, NA; Lainetti, R. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu de couro (*Echinodorus grandiflorus*, [Cham. E Schl.] Mitch., Alismataceae). (2003). *Revista Brasileira de Farmácia*, 84(1), 5-7.
- Cardoso, GLC; Pereira, NA; Lainetti, R. Avaliação da atividade do chapéu de couro (*Echinodorus grandiflorus*) (Cham. & Schl.) Mitch. (Alismataceae) sobre os níveis plasmáticos de colesterol em camundongos. *Rev. Bras. Farm.*, 2005, 86(3), 95-96.
- Coimbra, R. *Manual de Fitoterapia*. 2. ed. Belém: CEJUP, 1994, p. 91.
- Corrêa, P. M. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984, p. 214-215.
- Correa Júnior, C; Ming, LC; Scheffer, MC. *Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromática*. Curitiba: EMATER/PR, 1994, p. 135.
- Costa, M; Tanaka, CMA; Imamura, PM; Marsaioli, AJ. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. *Phytochemistry*, 1999, 50, 117-122.
- Duarte, MGR; Soares, IAA; Brandão, M; Jácome, RLRP; Ferreira, MD; Silva, CRF; Oliveira, AB. Phytochemical and antibacterial screening of Brazilian weed plants. 20 IUPAC INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIODIVERSITY, 1999, Belo Horizonte. *Livro de Resumos da 20 Iupac International Conference on Biodiversity*, Belo Horizonte, 1999, p, 188-95.
- Dutra, RC; Tavares, CZ; Ferraz, SO; Souza, OV; Pimenta, DS. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. *Revista Brasileira de Farmacologia*, 2006, 16(4), 469-474.
- Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil*. 1 ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1926.
- Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil*. 2 ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959.
- Gibaldi, D; Pimenta, DS; Soares, ROA; Fernandez-Ferreira, E; Bozza, MT; Henriques, MGMO; Figueiredo, MR; Kaplan, MAC. Trypanocidal activity of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli - Alismataceae. In: XXVIII ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGAS DISEASE & XVII ANNUAL MEETING OF BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGY, 2001, Caxambú, MG. *Livro de Resumos*, p. 91.
- Haynes, RR; Nielsen, LBH. *Flora Neotropica. The Alismataceae. Monograph 64*. Nova York: New York Botanical Garden, 1994, 105p.
- Joly, AB. *Botânica, introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Ed. Nacional, 1991, 777p.

- Kobayashi, J; Sekiguchi, M; Shigemori, H; Ohsaki, A. Chapecoderins A-C, new labdane-derived diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Journal of Natural Products*, 2000a, 63(3), 375-377.
- Kobayashi, J; Sekiguchi, M; Shigemori, H; Ohsaki, A. Echinophyllins A and B, novel nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Tetrahedron Letters*, 2000b, 41(16), 2939-2943.
- Kobayashi, J; Sekiguchi, M; Shimamoto, S; Shigemori, H; Ohsaki, A. Echinophyllins C-F, new nitrogen containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Journal of Natural Products*, 2000c, 63(11), 1576-1579.
- Leite, J PV. *Contribuição ao estudo farmacognóstico do Echinodorus macrophyllus (Kunth) Mich. (Chapéu de couro)*. 1995. 86p. Monografia (Especialização), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.
- Lessa, MA; Araujo, CV; Kaplan, MA; Pimenta, DS; Figueiredo, MR.; Tibiriçá, R. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves *Echinodorus grandiflorus*. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008, 22(2), 161-168.
- Lorenzi, H; Matos, FJA. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum LTDA, 2002, 512p.
- Mans, D; Hartmann, R. Echinodol: a new cembrene derivate from *Echinodorus grandiflorus*. *Planta Medica*, 1993, 59(5), 465-466.
- Martins, ER; Castro, DM; Castellani, DC. *Plantas medicinais*. Viçosa: Ed. Universitária-UFV, 1994, 220 p.
- Nogueira, DB. *Memento Terapêutico Fitoterápico*. Assessoria de Comunicação Social da Prefeitura de Ipatinga/MG. 2000, 48p.
- Pimenta, DS. *Contribuição ao cultivo, ecologia e validação do uso de Echinodorus grandiflorus (Chamisso & Schlechtendal) Micheli (Chapéu de couro)*. Tese. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, 2002.
- Pimenta, DS; Barros, ZA; Tibiriçá, E; Figueiredo, MR; Kaplan, MAC. Investigação da atividade hipotensora de extratos brutos de *Echinodorus grandiflorus* (Chamisso e Schlechtendal) Micheli - Chapéu de couro. *I Bienal de pesquisa da FIOCRUZ/ RJ*. 1998a, p. 88.
- Pimenta, DS; Fernandez-Ferreira, E; Soares, ROA; Gibaldi, D; Ribeiro Dos Santos, R; Figueiredo, MR; Kaplan, MAC. Avaliação de atividade tripanosomicida "in vitro" de *Echinodorus macrophyllus* (KUNTH) MICH. (chapéu de couro). In: XV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1998, Águas de Lindóia. *Livro de Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Águas de Lindóia, 1998b, p. 58.
- Pimenta, DS; Figueiredo, MR; Kaplam, MAC. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl) Micheli (Chapéu de couro). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2006, 78(4), 623-628.
- POLACCHINE, BS. *Avaliação do efeito anti-hipertensivo de Echinodorus grandiflorus em hipertensão experimental renovascular Irim-Iclipe e 2rins-Iclipe*. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Estadual de Londrina, PR, 2005, 58p.

- Ribeiro, RA; Melo, MMRF; Barros, F; Gomes, C; Trolin, G. Acute antihypertensive effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo. *Journal of Ethnopharmacology*, 1986, 15, 261-269.
- Ribeiro, RA; Barros, F; Melo, MMRF; Chieia, S; Wanderley, MG; Gomes, C; Trolin, G. Acute diuretic effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo, Brasil. *Journal of Ethnopharmacology*, 1988, 24: 19-29.
- Schnitzler, M; Petereit, F; Nahrstedt, A. Flavon-C-glycosides and Tartaric Acid derivatives from the Brazilian Medicinal Plant *Echinodorus grandiflorus* ssp. *aureus*. In: DPhG JAHRESTAGUNG AND JOINT MEETING, 2004, Münster.
- Scremin-Dias, E. *Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de Echinodorus paniculatus Micheli e Echinodorus tenellus (Mart.) Buchenau, durante os períodos da cheia e da seca no Pantanal Sul-Mato-Grossense*. 2000. 231p. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2000.
- Scremin-Dias, E; Barros, AL; Miyamura, EY. As características anatômicas são consistentes para separar as espécies de *Echinodorus*? In: 53º CONGRESSO ACIONAL DE BOTÂNICA E 25ª REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 2002, Recife, PE. *Livro de Resumos do 53º Congresso acional de Botânica e 25ª Reunião Nordestina de Botânica*, Recife, 2002, p. 190.
- Shigemori, H; Shimamoto, S; Sekiguchi, M; Ohsaki, A.; Kobayashi, J. Echinodolides A and B, New Cembrane Diterpenoids with an Eight-Membered Lactone Ring from the Leaves of *Echinodorus macrophyllus*. *Journal of Natural Products*, 2002, 65, 82-84.
- Souza, GC; Haas, APS; Von Poser, GL; Schapoval, EES; Elisabetsky, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 90(1), 135-143.
- Tanaka, CMA; Sarragioto, MH; Zukerman-Schpector, J; Marsaioli, AJ. Cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. *Phytochemistry*, 1997, 44(8), 1547-1549.
- Tanaka, CMA. *Constituintes químicos de cinco espécies de Echinodorus e avaliação do β -pineno como substrato para obtenção de quírons mais elaborados*, 2000, 298p. Tese (Doutorado). UNICAMP, Campinas, SP, 2000.
- Teske, M; Trentini, AMM. *Herbarium: Compêndio de Fitoterapia*. 2 ed. Curitiba: Herbarium Lab. Bot., 1995, 317p.
- Tibiriçá, E; Almeida, A; Cailleaux, S; Pimenta, DS; Kaplan, MA; Lessa, MA; Figueiredo, MR. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 111, 50-55.
- Vieira, MF; Lima, NAS. Pollination of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae). *Aquatic Botany*, 1997, 58, 89-98.

APÊNDICE B**REPRODUCTIVE TOXICITY OF *ECHINODORUS GRANDIFLORUS* IN PREGNANT RATS**

MANUSCRITO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

THE JOURNAL OF TOXICOLOGICAL SCIENCES, ISSN 0388-1350

Aceite para publicação

De: "scied_j.toxicol.sci@senkyo.co.jp"
<scied_j.toxicol.sci@senkyo.co.jp>
Adicionar a contatos
Para: soniabrugiollo@yahoo.com.br
Cc: naganuma@mail.pharm.tohoku.ac.jp

Dear Dr. Brugiollo,

We are pleased to inform you that the manuscript mentioned below has been accepted for publication in The Journal of Toxicological Sciences. Thank you for considering The Journal of Toxicological Sciences for publication of your excellent work.

For publication, your accepted manuscript needs to be edited by our editorial office, Sendai Kyodo Printing Co., Ltd.. Please send your final manuscript file(s) [text file (MS-Word), figure file(s), and table file(s)] to the editorial office through the following website.

* Website for file up: https://www.e-kenkyu.com/j_toxicological_attach_files/

If you have any questions regarding "file up", please send an e-mail to the editorial office <j.toxicol.sci_publisher@senkyo.co.jp>.

Sincerely yours,

Akira Naganuma, Ph.D.
Editor
The Journal of Toxicological Sciences
E-mail: naganuma@mail.pharm.tohoku.ac.jp
Office of SciEd: scied_j.toxicol.sci@senkyo.co.jp

MS.No. : JTS-10073
Type of Manuscript : Letter
Title : Reproductive toxicity of Echinodorus grandiflorus in pregnant rats
Authors : Sônia Sin Singer Brugiollo, Vera Maria Peters, Daniel Sales Pimenta, Beatriz Julião
Vieira Aarestrup, Alessa Sin Singer Brugiollo, Dayana Mendes Ribeiro, Martha de Oliveira Guerra
Corresponding Author: Sônia Sin Singer Brugiollo

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
 PRO-REITORIA DE PESQUISA
 Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 001/2007-CEA sobre “Avaliação da fitotoxicidade do extrato aquoso liofilizado de *Echinodorus grandiflorus* (chapéu de couro) na reprodução de ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769”, projeto de ensino sob a responsabilidade de Sônia Sin Singer Brugiolo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 09/01/2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 001/2007-CEA about “Avaliação da fitotoxicidade do extrato aquoso liofilizado de *Echinodorus grandiflorus* (chapéu de couro) na reprodução de ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769” =, Sônia Sin Singer Brugiolo is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 09/01/2007.

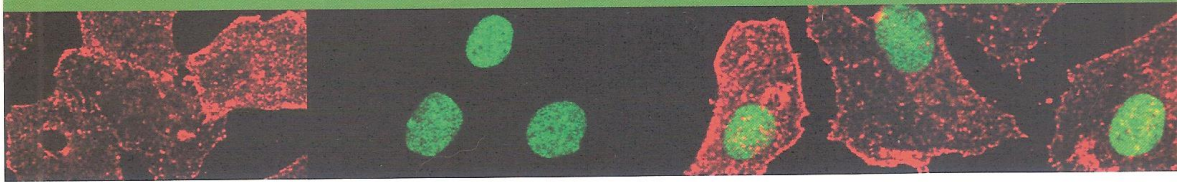
Juiz de Fora, 10 de janeiro de 2007



Presidente/CEEA



Secretário/CEEA

ANEXO B**FeSBE 2008**

20 a 23 de agosto de 2008
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 35.023

TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO DE CHAPÉU
DE COURO (*E. grandiflorus*) EM RATAS PRENHES
BRUGIOLO, S. S. S., PETERS, V. M., PIMENTA, D. S. P., GUERRA,
M. O.

Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF Prog.PGSB/UFJF, foi
apresentado sob a forma de painel

na XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia
Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,
de 20 a 23 de agosto de 2008.

A handwritten signature in black ink, appearing to be a stylized name.

Comissão Organizadora