

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

EFEITOS DO TRATAMENTO COM EXTRATO DA *Passiflora nitida Kunth*
NO PERÍODO PERINATAL

Bolsista: Raquel Cavalcanti Maranhão, FAPEAM

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB – S – 0119 2013/2014

EFEITOS DO TRATAMENTO COM EXTRATO DA *Passiflora nitida Kunth*
NO PERÍODO PERINATAL

Bolsista: Raquel Cavalcanti Maranhão, FAPEAM

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Geane Antiques Lourenço

MANAUS

2014

Todos os direitos desse relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Departamento de Ciências Fisiológicas/Farmacologia e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Amazonas - FAPEAM, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Departamento de Ciências Fisiológicas/Farmacologia e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Etnofarmacologia do Amazonas

RESUMO

O uso de plantas medicinais durante a gestação ou lactação é um assunto delicado uma vez que podem causar estímulo da contração uterina e conseqüentemente aborto ou parto prematuro, ação sobre o sistema hormonal que possibilite alterações no desenvolvimento fetal ou do sexo da criança e ações mutagênicas e teratogênicas que podem levar a má formação do feto. A espécie *Passiflora nitida Kunth* comumente conhecida como “maracujá-do-mato” e usada pela população local para distúrbios gastrointestinais, praticamente não foi estudada até o momento, nenhum estudo mostra perfil toxico definido e alterações no desenvolvimento pós-natal. A proposta deste projeto é efetuar uma avaliação farmacológica dos efeitos do extrato das folhas de *Passiflora nitida Kunth* sobre o sistema nervoso central e verificar os possíveis efeitos desse extrato na exposição pré-natal. Para o experimento foram utilizados filhotes na idade pós-natal obtidos do cruzamento de ratos Wistar macho e fêmeas, sexualmente maduros; As ratas com diagnóstico de prenhes confirmado foram divididas em quatro grupos. Grupo 1: controle com solução salina, Grupo 2 : tratadas no 10º dia gestacional com o extrato da Passiflora na dose de 150mg/kg, Grupo 3: tratadas no 15º dia gestacional com o extrato da Passiflora na dose de 150mg/kg e Grupo 4: tratamento prolongado com a dose de 50mg/kg. A administração foi por via oral (vo) através da gavagem, e o extrato utilizado foi o hidroetanolico obtido das folhas da *Passiflora*. Os filhotes das fêmeas tratadas foram observados e avaliados quanto ao seu desenvolvimento físico e reflexiológico. Os animais não mostraram alterações no desenvolvimento físico (exceto peso corpóreo), quando avaliados nos reflexos neurológicos, mostraram déficits evidentes no Reflexo Postural e uma diminuição na latência para a ocorrência da Preensão Palmar. De modo geral, a administração do extrato causa alterações do desenvolvimento neurocomportamental das proles.

Palavras- chave: *Passiflora nítida Kunth*; Estudos perinatais; Teratogênese.

ABSTRACTS

The use of herbs during pregnancy or lactation is a delicate matter since they can cause stimulation of uterine contraction and consequently abortion or premature delivery, action on the hormonal system enabling changes in fetal development or sex of the child and mutagenic actions and teratogens that can lead to birth defects. According to Carvalho (2008), *Passiflora nitida* Kunth species commonly known as "maracujá-do-mato" and used by the local population for gastrointestinal disorders, has scarcely been studied so far, no study shows toxicological profile defined and changes in postnatal development. The purpose of this project is to perform a review of the pharmacological effects of the extract of leaves of *Passiflora nitida* Kunth on development of the central nervous system and check the possible effects of this extract on prenatal exposure. For the experiment pups in postnatal age obtained by crossing male and female Wistar rats, were used sexually mature; The female rats diagnosed with confirmed pregnant were divided into four groups. Group1: control saline, Group 2: treated on the 10th gestational day with *Passiflora* extract at a dose of 150mg/kg, Group 3: treated on the 15th gestational day with *Passiflora* extract at a dose of 150mg/kg and Group 4: prolonged treatment with the dose of 50mg/kg. The administration was orally (vo) by gavage and the extract used was obtained from the leaves of hidroetalólico *Passiflora nítida*. The offspring of treated females were observed and evaluated for their physical development and reflexiológico. It was observed that at a dose of 150mg/kg on the 10th day there was neurobehavioral alterations. At the same dose only on day 15 and term treatment with the dosage of 50mg/kg day there was physical and neurobehavioral changes. Generally and subtly, the administration of the extract of *Passiflora nítida* Kunth in the dosage of 50mg/kg long way in pregnant rats and 150mg/kg in the 10th and 15th gestational day cause changes in the physical and behavioral development of the offspring.

Keywords: *Passiflora nítida* Kunth, Perinatal Studies; Teratogenesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema e Bernardi (1999).....	13
Figura 2 - Preensão palmar.....	19
Figura 3 – Reflexo postural.....	20
Figura 4– Geotaxia negativa.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado do teste de Preensão Palmar dos filhotes de mães do Grupo 2.....	21
Tabela 2 - Resultado do teste de Reflexo Postural dos filhotes de ratas do Grupo 2.....	22
Tabela 3 – Alteração no peso dos filhotes de ratas do Grupo 3.....	23
Tabela 4 – Resultado do teste de Reflexo Postural dos filhotes de ratas tratadas do Grupo 3.....	24
Tabela 5 – Alteração no peso dos filhotes de ratas do Grupo 4.....	25
Tabela 6 – Resultado do teste de Preensão Palmar dos filhotes de ratas do Grupo 4.....	25
Tabela 7 - Resultado do teste de Reflexo Postural dos filhotes de ratas do Grupo 4.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 ESTUDOS PERINATAIS.....	11
2.2 <i>Passiflora nitida Kunth</i>	15
3. DESCRIÇÃO METODOLÓGICA.....	16
3.1-Sujeitos experimentais.....	16
3.2-Análise de Toxicidade do extrato da <i>Passiflora nitida Kunth</i> por Exposição Pré-Natal.....	17
3.21- Cruzamento de animais e diagnóstico de prenhez.....	17
3.22- Avaliação do Desenvolvimento Reprodutivo Materno.....	18
3.23-Avaliação do desenvolvimento físico pós-natal.....	18
3.24-Avaliação do desenvolvimento reflexiológico pós-natal.....	19
3.25- Análises estatísticas.....	20
4 RESULTADOS	21
5 DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	34

1.INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de patologias é mais antigo que a espécie humana, pois muitos animais já utilizavam instintivamente esse recurso antes do homem surgir sobre a Terra. Mesmo hoje em dia o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades. As plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a Terra. Nas últimas décadas esse manancial de moléculas distintas e complexas começou a se desvendar, devido à evolução dos métodos de análise e separação destes compostos. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas com bases científicas (Montanari e Bolzani, 2001).

O avanço tecnológico e científico no estudo de plantas medicinais se faz evidente pela crescente descoberta de novos compostos com propriedades terapêuticas e pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais ativos, como *Phytomedicine*, *Phytochemical Analysis*, *Natural Product Letter*, entre outros (Cechinel-Filho e Yunes, 1998).

Não há dúvidas que dentre tantas espécies vegetais da flora Amazônica existem substâncias que ainda nem foram caracterizadas, mas que possuem um grande potencial de se tornarem medicamentos capazes de alterar a história terapêutica mundial. Demonstra-se com isso que não basta ter uma rica biodiversidade se a ela não se associar um enorme esforço concentrado de pesquisa que possa cobrir todos os passos da bioprospecção, que vão desde o inventário biológico até o patenteamento e o

licenciamento, passando pelas etapas especificamente laboratoriais e os ensaios clínicos. Para que essas substâncias saiam da floresta para a utilização em larga escala existe um caminho extenso e árduo, mas que deve ser iniciado o mais rápido possível se quisermos deter o controle sobre essa potencial biodiversidade.

Infelizmente a maior parte dos fitoterápicos utilizada atualmente por automedicação ou por prescrição médica não apresenta perfil tóxico definido, justamente pela falta de avaliação em testes biológicos destes compostos. A utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode produzir problemas graves (Silveira, et al, 2008). O aumento do risco de toxicidade humana ocorre porque as plantas medicinais ou seus derivados são utilizados concomitantemente com drogas alopáticas, em idades extremas (crianças e idosos), durante a gravidez e na presença de doenças crônicas que alteram o metabolismo (Pinn, 2001).

O uso de plantas medicinais durante a gestação ou lactação é também um assunto delicado uma vez que podem causar estímulo da contração uterina e conseqüentemente aborto ou parto prematuro; ação sobre o sistema hormonal que possibilite alterações no desenvolvimento fetal ou do sexo da criança; ações mutagênicas e teratogênicas que podem levar a má formação do feto (Silveira, et al, 2008).

Para o bom desenvolvimento de um ser vivo é necessário que se tenha uma complexa coordenação de divisões, migrações e interações celulares, regulação gênica e diferenciação. Qualquer substância que possa interferir nestes processos pode causar malformações no embrião. Com isso, a preocupação e investigação com agentes exógenos capazes de causar mortes ou anomalias comportamentais e estruturais no neonato, têm aumentando. Análises simples de animais experimentais neonatos

oriundos de mães tratadas com fitoterápicos durante a gestação, mostram informações sobre a toxicidade destes compostos. A análise do desenvolvimento ponderal, reflexiológico e físico dos filhotes, fornecem informações valiosas sobre as possíveis alterações ocasionadas durante a gestação e praticamente sem custos.

A proposta deste projeto é efetuar uma avaliação farmacológica dos efeitos do extrato das folhas de *Passiflora nitida Kunth* sobre o sistema nervoso central, além de verificar os possíveis efeitos desse extrato na exposição pré-natal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTUDOS PERINATAIS

A gestação é um processo dinâmico envolvendo crescimento e desenvolvimento do embrião/feto e crescimento e alterações fisiológicas do sistema materno. Da concepção ao nascimento o embrião/feto humano aumenta em peso mais ou menos um bilhão de vezes enquanto o organismo materno pode aumentar mais ou menos de 15% a 20%. Entretanto as mudanças no sistema materno durante a gestação vão além de crescimento e incluem alterações na absorção, distribuição, metabolismo e excreção de nutrientes e xenobióticos para melhor suprir e proteger o sistema em desenvolvimento (Walton, 1992).

Durante o período de gestação os níveis de progesterona materno podem estimular enzimas celulares e conseqüentemente, aumentar a metabolização de substâncias químicas que, por sua vez, alteram sua toxicidade, aumentando-a ou diminuindo-a dependendo do metabólito formado (Lemonica, 1996).

Em mamíferos, a exposição materna a substâncias tóxicas pode causar desvios comportamentais nas mães; é a chamada toxicidade materna, e têm como

consequência, perturbações no desenvolvimento da prole, mesmo que esta não tenha contato direto, via placenta, com a substância (Franková, 1985). Outras substâncias, mesmo sem alterar aparentemente o metabolismo da mãe, podem alcançar o feto e causar danos diretamente sobre ele através de passagem pela placenta e penetração na circulação fetal (Cruttenden, 2003).

A exposição a uma substância tóxica pode ocorrer durante todo o ciclo reprodutivo nos mamíferos. Conforme o período do ciclo reprodutivo, a susceptibilidade individual e entre espécies e a intensidade da exposição, as consequências podem ser bastante variadas (Lemonica, 1996).

Nos mamíferos o desenvolvimento ocorre em quatro fases: implantação, organogênese, desenvolvimento fetal e neonatal (Manson e Kang, 1989).

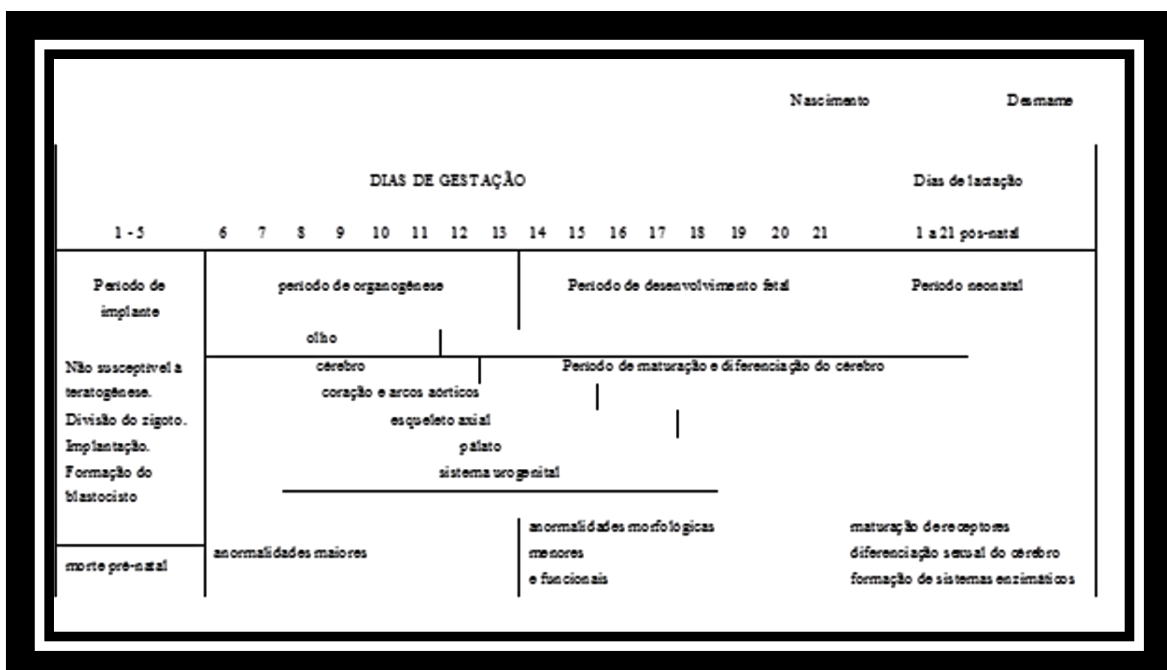
A fase de implantação começa na fecundação do óvulo e vai até o implante do blastocisto no útero materno, nesta fase um agente tóxico pode provocar embriofetalidade, sendo bastante rara a ocorrência de teratogênese (Bernardi 1999). O período seguinte, chamado de organogênese, inicia-se na fase de proliferação celular e vai até a formação de órgãos rudimentares. O desenvolvimento embrionário é mais sensível aos insultos durante este período, durante o qual cada órgão/tecido exibe um período crítico de maior susceptibilidade às injúrias. Nem todos os órgãos e tecidos crescem na mesma razão ou são sensíveis a insultos pelos mesmos agentes ou ainda, exibem as mesmas características dose-resposta (Walton, 1992).

Nesta fase os agentes tóxicos podem levar à teratogênese caso a alteração seja compatível com a vida do indivíduo, caso contrário, à embriofetalidade. É neste período que ocorre a maioria das anomalias do desenvolvimento. Cada um dos sistemas que compõe o organismo do animal apresenta um tempo diferente de desenvolvimento e conseqüentemente um período crítico particular dentro da

organogênese no qual ele é mais susceptível aos agentes tóxicos. (Bernardi, 1999). No desenvolvimento fetal e neonatal os órgãos começam a apresentar crescimento tecidual e maturação. As anomalias neste período são mais sutis do que nas que ocorrem no período de organogênese (Manson e Kang, 1989).

Várias espécies animais apresentam, durante o período de desenvolvimento, diferentes períodos críticos, porém existe em algumas delas, bastante similaridade com os respectivos períodos na espécie humana (Bernardi, 1999). O rato é o animal de escolha para estes testes (OECD, 2001). Os diversos períodos de desenvolvimento são distintos para as diversas espécies animais. No rato, o implante do blastocisto ocorre até o sétimo dia de gestação; o término da organogênese para a maioria dos órgãos, no décimo quinto dia; o desenvolvimento fetal ocorre daí, até o final da gestação. Após o nascimento inicia-se o período pós-natal onde os filhotes continuam seu desenvolvimento extrauterino (Bernardi, 1999).

Figura 1. Esquema de Bernardi (1999) ilustra os períodos críticos dos diversos órgãos dos ratos.



A exposição materna a várias substâncias durante a gravidez e a lactação pode causar desenvolvimento de neurotoxicidade e/ou anormalidades comportamentais nos descendentes, que pode persistir através de toda vida dos desses indivíduos (Palermo-Neto, 1994 – AMITRAZ).

As modificações produzidas no feto e no neonato podem aparecer durante o desenvolvimento do animal, não sendo detectáveis pela simples observação macro ou microscópica, sendo necessários estudos comportamentais, bioquímicos e de biologia molecular, eletrofisiológicos, etc. Estes tipos de modificações são chamados efeitos teratogênicos sutis (Nasello, 1997). As substâncias então, também podem agir sobre a prole como teratógenos comportamentais que produzem nesta, apenas mudanças comportamentais (Castro, 1998).

Os ratos, ao nascer, têm um sistema nervoso central imaturo, com deficiente irrigação cerebral e ausência de barreira hematoencefálica (Bernardi, 1999). Seu desenvolvimento acontece no decorrer o período pós-natal. Qualquer influência que o feto possa sofrer durante a gestação, desde a organogênese até a amamentação pode agir sobre esse processo, podendo causar desde anomalias sutis até teratogênese. O desenvolvimento pós-natal da atividade motora do rato compreende alguns processos comportamentais como o desenvolvimento da postura e locomoção quadrúpede, ajustes dinâmicos posturais, algumas respostas de orientação e de habilidade motoras complexas. Por testes comportamentais é possível avaliar tais parâmetros nos animais (Dorce, 2006).

2.2.Passiflora nitida Kunth

O composto escolhido para o desenvolvimento desse projeto é o extrato das folhas da *Passiflora nitida Kunth* (maracujá-do-mato ou maracujá-suspiro), que em experimentos prévios (Carvalho, 2008), produziu um efeito de alteração comportamental aparentemente de origem central, dependente da dose. Porém na literatura constam apenas dados da atividade desse extrato sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea (Carvalho, et. Al., 2010). Várias espécies do gênero *Passiflora*, denominadas popularmente como maracujá, são empregadas extensivamente na medicina popular em muitos países, sob diversas formas farmacêuticas.

A *Passiflora nítida* cresce espontaneamente em vegetação secundária, beira de rios e estradas e seus frutos são consumidos in natura pela população local da Região Amazônica (Hopkins e Souza, 1999). Não existem estudos sobre a ação dessa espécie vegetal sobre o sistema nervoso central, porém outras espécies do mesmo gênero são amplamente utilizadas com comprovado efeito ansiolítico, sedativo, anti-inflamatório, antinociceptivo, anti-inflamatório (Di Stasi, et. Al., 2002; Dhawan e Sharma, 2002, 2003).

Como exemplo podemos citar a *Passiflora incarnata*, que atua ao nível da medula espinhal, provavelmente por interação com receptores das endorfinas naturais, diminuindo os estímulos externos que chegam ao SNC. É utilizada eficazmente em crise de ansiedade, insônia e hiperexcitabilidade nervosa induzindo a um sono próximo do fisiológico, sem causar a depressão psíquica e a lentidão dos reflexos, comuns aos hipnóticos e tranquilizantes (Dhawam, et. al., 2004).

Quanto às características fitoquímicas da *Passiflora nitida*, (Carvalho, 2008), anti-inflam, cumarinas e taninos, são as substâncias ativas majoritárias neste extrato e, conforme

descrito na literatura, são compostos ativos em nível central. Os anti-inflam são compostos de origem vegetal muito estudados e que demonstram efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, anti-inflamatório, hipolipidêmico, antiplaquetário (Machado, et. al., 2008).

3.DESCRICÃO METODOLÓGICA

3.1- Sujeitos experimentais:

Filhotes na idade pós-natal serão obtidos do cruzamento de ratos Wistar macho e fêmeas, sexualmente maduros, pesando entre 180 e 250g. Todos os animais experimentais serão mantidos em condições padronizadas no biotério do Instituto de Ciências Biológicas - UFAM. O trabalho será realizado observando-se os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (1991). Esse projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) e foi considerado aprovado.

Observações: Nos experimentos anteriores com a *Passiflora nitida* utilizou-se extrato aquoso, etanólico e hexânico, mas o extrato hora disponível é hidroalcólico. Portanto as doses utilizadas nos experimentos descritos a seguir, foram determinadas em teste piloto, onde fixamos duas doses que foram utilizadas em todos os experimentos, sendo estas as dosagens de 150mg/kg (tratamento, administração do extrato, em dias específicos: 10º e 15º dia

gestacional) e 50 mg/kg(tratamento prolongado, administração do extrato iniciando a partir do segundo dia e tendo o término programado para o 20º dia gestacional).

3.2 - Análise de Toxicidade do extrato da Passiflora nitida Kunth por Exposição Pré-Natal

3.21- Cruzamento de animais e diagnóstico de prenhez:

As ratas foram agrupadas em gaiolas de polietileno com tampa metálica contendo três fêmeas cada. Um macho foi colocado no final do dia aproximadamente às 17 horas e retirado pela manhã do dia seguinte (por volta das 9:00h). As fêmeas foram avaliadas quanto à presença de espermatozoides através de lavado vaginal. O lavado vaginal consiste em injeção de 60 microlitros de solução salina, com ajuda de uma micropipeta, no canal vaginal da rata e da retirada desta solução com esta mesma pipeta. Este líquido é colocado na lâmina e observado ao microscópio onde se verifica a presença de espermatozoides e células indicativas de estro (caracterizada como fase estrogênica máxima, onde se encontram apenas células queratinizadas) para confirmação do diagnóstico de prenhez (dia zero de gestação). Após esta confirmação as fêmeas foram separadas individualmente. Os machos e as fêmeas não prenhes foram utilizados em novos cruzamentos.

3.22 - Avaliação do Desenvolvimento Reprodutivo Materno:

Ratas prenhes receberam tratamento com o extrato ou o veículo de diluição, via oral, prolongado (administrações iniciadas no 2º dia gestacional e finalizando no 20 dia gestacional) e agudo em dias específicos do período gestacional (10º e 15º dia gestacional). Os filhotes foram avaliados quanto à presença de anomalias fenotípicas macroscópicas, além de serem pesados no segundo dia de vida, no sétimo e no décimo segundo dia de vida para estimativa de um possível efeito tóxico do extrato. A manipulação dos filhotes ocorreu sempre a partir do segundo dia de vida, com o objetivo de evitar o risco de rejeição dos mesmos pelas mães.

3.23 - Avaliação do desenvolvimento físico pós-natal:

Os filhotes de mães tratadas com o extrato ou com a solução veículo foram analisados quanto ao aparecimento dos parâmetros desdobramento de orelhas, erupção dos dentes incisivos, abertura dos olhos e abertura do orifício do ouvido. Cada filhote foi marcado e observado individualmente todos os dias no mesmo período até o surgimento dos parâmetros citados. A pesagem dos filhotes foi realizada a cada 5 dias, iniciando-se no segundo dia de vida e terminando no décimo segundo dia de vida.

3.24 - Avaliação do desenvolvimento reflexiológico pós-natal:

Os animais nascidos de mães tratadas com o extrato ou com veículo por período agudo ou prolongado durante a gestação foram submetidos aos testes:

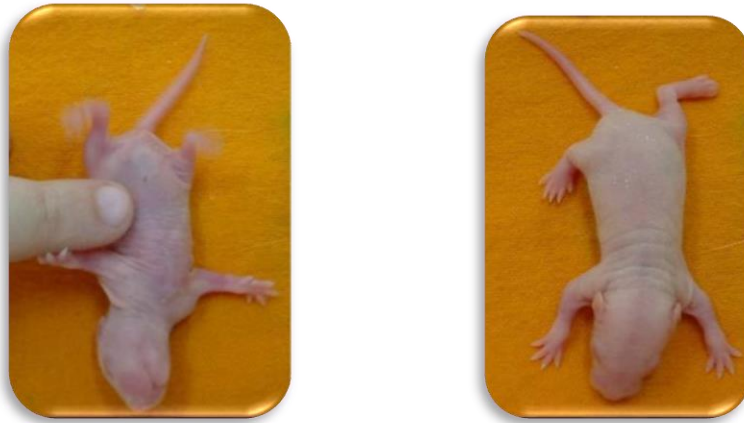
a) Preensão palmar: O animal será contido por uma das mãos do pesquisador, com o cuidado de não tocar sua pata esquerda dianteira. Ao contato com a ponta de um lápis a pata se fecha segurando o objeto. Este é o critério para se considerar que houve ocorrência do reflexo, porém a latência para que o reflexo ocorra também será avaliado (cronometragem do tempo para ocorrência do reflexo). O teste foi realizado nos dias 4, 6 e 8 de vida.

Figura 2 – Preensão palmar



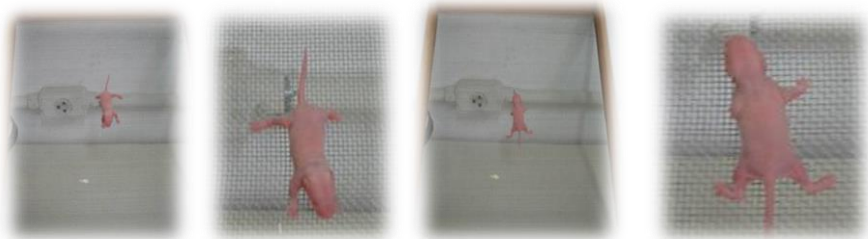
b) Reflexo postural: O animal é colocado em decúbito dorsal e medido o tempo que o mesmo leva para virar o corpo e ficar na posição de decúbito ventral com as quatro patas apoiadas na superfície. O teste foi realizado nos dias 4, 6, 8 e 10 de vida.

Figura 3 – Reflexo postural



c) Geotaxia negativa: O animal será colocado em uma rampa de material antiderrapante de aproximadamente 45° graus de inclinação a 5 cm da borda inferior desta superfície, com a cabeça direcionada para baixo. O resultado esperado para este teste será que o animal se volte para a posição oposta, ou seja, com a cabeça voltada para cima. O tempo necessário para a ocorrência do reflexo será cronometrado. O teste foi realizado nos dias 6, 8,10 e 12 de vida.

Figuras 4 – Geotaxia negativa



3.25 Análises estatísticas:

Os dados foram analisados utilizando-se primeiramente o teste de Bartlett para determinação da distribuição paramétrica ou não paramétrica. Por esta análise os

dados considerados com distribuição paramétrica foram analisados utilizando o teste ANOVA seguido do teste de Tukey Kramer. O intervalo de confiança aceitável será de 5% ($p < 0,05$).

4.RESULTADOS

Experimento 1- Efeitos da administração do extrato da *Passiflora nítida Kunth* sobre parâmetros do desenvolvimento físico e comportamental da prole de ratas tratadas com 150mg/kg no 10º dia de prenhez.

Em relação ao desenvolvimento físico dos filhotes de mães tratadas comparados ao grupo controle, observou-se que o desdobramento das orelhas, erupção dos dentes incisivos, abertura do orifício do ouvido e abertura dos olhos não sofreram alterações. A variação de peso dos filhotes de mães tratadas não foi significativa para todos os períodos analisados.

Quanto ao desenvolvimento neurocomportamental da prole foi observada uma diminuição da latência para a ocorrência do reflexo de preensão palmar dos filhotes no 8º dia de vida, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Resultado do teste de Preensão Palmar dos filhotes de ratas do Grupo 2.

Dias de observação do Reflexo Preensão palmar	Controle (salina)	Tratado no 10º dia (150mg/kg)
4º dia de vida	1,91 ± 0,33	1,84 ±0,22
6º dia de vida	1,33±0,22	1,01±0,04
8º dia de vida	2,70±0,52	0,98±0,11***

- Os dados se referem à média ± erro padrão da média

***Significativamente diferente do controle (p< 0,05) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer

Para o reflexo postural, observou-se aumento do tempo de retorno ao endireitamento do corpo no 10º dia de vida dos filhotes como mostra a tabela 2.

Tabela 2. Resultado do teste de Reflexo Postural dos filhotes de ratas do Grupo 2.

Dias de observação do Reflexo Postural	Controle (salina)	Tratado no 10º dia (150mg/kg)
4º dia de vida	6,66 ± 1,52	14,55 ±5,81
6º dia de vida	4,03±1,71	2,42±0,32
8º dia de vida	1,45±0,20	2,11±0,21
10º dia de vida	0,76±0,14	1,29±0,08*

- Os dados se referem à média ± erro padrão da média

*Significativamente diferente do controle (p< 0,05) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer

Quanto ao reflexo de geotaxia negativa não houve alteração em relação ao grupo controle, do tempo necessário para voltar da cabeça para cima, em posição oposta ao que o animal foi colocado.

Experimento 2- Efeitos da administração do extrato da *Passiflora nítida Kunth* sobre parâmetros do desenvolvimento físico e comportamental da prole de ratas tratadas com 150mg/kg no 15º dia de prenhez.

Durante e algumas horas após a administração do extrato duas fêmeas não reagiram bem a gavagem, ficaram sonolentas e pouco ativas. Em relação ao desenvolvimento físico dos filhotes de mães tratadas comparados ao grupo controle, observou-se que o desdobramento das orelhas, erupção dos dentes incisivos, abertura do orifício do ouvido e abertura dos olhos não sofreram alterações. Entretanto, houve um aumento do peso de filhotes fêmeas no 12º dia de vida, e uma diminuição do peso dos filhotes machos no dia 2º.(Tabela 3) .Em algumas ninhadas foi observado que na região correspondente a região dos rins apresentava-se bem edemaciada quando comparados com o grupo controle.

Tabela 3. Alteração no peso dos filhotes de ratas do Grupo 3.

Período de vida	Controle (salina)	Tratado no 15º dia (150mg/kg)
Fêmea 12º dia de vida	18,98 ± 0,23	22,68 ± 0,33***
Machos 2º dia de vida	7,19 ± 0,13	6,48 ± 0,19**

- Os dados se referem à média ± erro padrão da média

**

*** Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer

No desenvolvimento neurocomportamental de filhotes de mães tratadas não houve alteração, em relação ao grupo controle, do tempo necessário para ocorrência do reflexo de prensão palmar nos dias observados. Para o reflexo postural, observou-se aumento do tempo de retorno ao endireitamento do corpo no 10º dia de vida dos filhotes como mostra a tabela 4.

Tabela 4. Resultado do teste de Reflexo Postural dos filhotes de ratas tratadas no Grupo 3.

Dias de observação do Reflexo Postural	Controle (salina)	Tratado no 15º dia (150mg/kg)
4º dia de vida	6,66 ± 1,52	19,19 ±10,36
6º dia de vida	4,03±1,71	2,60±0,25
8º dia de vida	1,45±0,20	1,95±0,28
10º dia de vida	0,76±0,14	1,41±0,07**

- Os dados se referem à média ± erro padrão da média

** Significativamente diferente do controle (p< 0,05) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer

Quanto ao reflexo de geotaxia negativa não houve alteração em relação ao grupo controle, do tempo necessário para voltar da cabeça para cima, em posição oposta ao que o animal foi colocado.

Experimento 3- Efeitos da administração do extrato da *Passiflora nítida Kunth* sobre parâmetros do desenvolvimento físico e comportamental da prole de ratas tratadas com 50mg/kg no tratamento prolongado.

Em relação ao desenvolvimento físico dos filhotes de mães tratadas comparados ao grupo controle, observou-se que o desdobramento das orelhas, erupção dos dentes incisivos, abertura do orifício do ouvido e abertura dos olhos não sofreram alterações. Entretanto, houve um aumento do peso de filhotes fêmeas e machos no 12º dia de vida (tabela 5).

Tabela 5 Alteração no peso dos filhotes de ratas do Grupo 4.

Período de vida	Controle (salina)	Tratamento Prolongado (50mg/kg)
Fêmea 12º dia de vida	18,98 ± 0,23	21,97 ± 0,50**
Machos 12º dia de vida	19,87 ± 0,38	22,60 ± 0,50*

- Os dados se referem à média ± erro padrão da média

** Significativamente diferente do controle (p < 0,05) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer

Quanto ao desenvolvimento neurocomportamental da prole foi observada uma diminuição da latência para a ocorrência do reflexo de preensão palmar dos filhotes no 6º e 8º dia de vida, como pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6. Resultado do teste de Preensão Palmar dos filhotes de ratas Do Grupo 4.

Dias de observação do Reflexo Preensão palmar	Controle (salina)	Tratamento Prolongado (50mg/kg)
4º dia de vida	1,91 ± 0,33	1,12 ± 0,27
6º dia de vida	1,33 ± 0,22	0,65 ± 0,08**
8º dia de vida	2,70 ± 0,52	0,60 ± 0,07***

- Os dados se referem à média ± erro padrão da média

** Significativamente diferente do controle (p < 0,05) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer

Para o reflexo postural, observou-se aumento do tempo de retorno ao endireitamento do corpo no 6º dia de vida dos filhotes como mostra a tabela 7.

Tabela 7. Resultado do teste de Reflexo Postural dos filhotes de ratas do Grupo 4.

Dias de observação do Reflexo Postural	Controle (salina)	Tratamento Prolongado (50mg/kg)
4º dia de vida	6,66 ± 1,52	5,33 ±1.42
6º dia de vida	4,03±1,71	0,95±0,12**
8º dia de vida	1,45±0,20	0,54±0,05
10º dia de vida	0,76±0,14	0,48±0,03

- Os dados se referem à média ± erro padrão da média

** Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer

Quanto ao reflexo de geotaxia negativa não houve alteração em relação ao grupo controle, do tempo necessário para voltar da cabeça para cima, em posição oposta ao que o animal foi colocado.

5 – DISCUSSÃO

As plantas medicinais são empregadas na prevenção, tratamento, cura de distúrbios, disfunções ou doenças como primeiro recurso medicinal desde a Antiguidade, tendo representado a base da terapêutica durante muitos anos. São usadas popularmente contra várias doenças infecciosas e parasitárias, vetores, problemas crônico-degenerativos,

emagrecimento, para a regulação da menstruação, com intuito abortivo e até como antídoto ao veneno de cobra (Carvalho, 2008).

O interesse da população em drogas de origem vegetal e o estímulo ao uso destas deve-se a várias razões, entre as quais, a dificuldade de acesso aos medicamentos industrializados, os efeitos colaterais da terapêutica convencional, além do conceito equivocado de que produtos naturais não fazem mal à saúde. No entanto, a grande maioria das plantas medicinais é utilizada de forma empírica, sem a devida comprovação científica de suas virtudes farmacológicas (Carvalho, 2008).

Plantas amazônicas são usadas terapeuticamente em diversas condições patológicas. O uso do gênero *Passiflora* (Passifloraceae) é descrito na literatura para tratar doenças do SNC, cardiovasculares, processos inflamatórios e dor. No entanto, a espécie *Passiflora nitida* Kunth comumente conhecida como “maracujá-do-mato” e usada pela população local para distúrbios gastrointestinais, praticamente não foi estudada até o momento. (Carvalho, 2008). Nenhum dos estudos mostra perfil tóxico definido e alterações no desenvolvimento pós-natal, justamente pela falta de avaliação em testes biológicos deste composto. O que representa um grande risco, pois de acordo com Silveira, et. Al. a utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode produzir problemas graves. Em vista disso, é importante haver estudos nesta área, já que não existe dado na literatura sobre a exposição pré-natal ao extrato da *Passiflora nítida* Kunth. Com isso, novos dados científicos sobre esse extrato seriam obtidos, discutindo os possíveis benefícios e riscos que esse composto poderia ocasionar no período gestacional e ao posterior desenvolvimento do indivíduo.

As dosagens utilizadas nesse experimento foram baixas, 150mg/kg em dias específicos (10º e 15º dias gestacionais) e 50mg/kg de forma prolongada, visto que o agente utilizado nos estudos de efeitos perinatais deve ser administrado em dose mínima, com a qual

não sejam observados efeitos tóxicos na mãe ou no concepto. A administração de doses que levam ao aparecimento de sintomas acentuados de intoxicação não permite concluir se as alterações apresentadas pelo filhote seriam devidas à ação embriofetotóxica da substância em estudo ou às alterações na homeostase materna causadas pela intoxicação, o que viria a comprometer as trocas materno/fetais (Lemônica, 1996).

Nesse trabalho optou-se em utilizar duas dosagens do extrato da *Passiflora nítida* Kunth. A dosagem de 150mg/kg que teve como objetivo analisar o efeito sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e a toxicidade do extrato em dias críticos para o desenvolvimento fetal, 10º dia - ápice da organogênese - e 15º dia - ápice do desenvolvimento fetal -, simulando o uso de maneira única e isolada do extrato, na forma de chá concentrado ou ingestão das folhas, pelas gestantes para alívio de algum distúrbio.

Já a dosagem de 50mg/kg teve como objetivo analisar o efeito sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e a toxicidade do extrato de maneira prolongada (iniciando no 2º dia de gestação indo até o 20º dia gestacional), simulando o uso de maneira contínua do extrato, na forma de chá, pelas gestantes para alívio dos sintomas da gravidez. Com essas dosagens os animais testados não apresentaram sinais e sintomas associados à intoxicação.

Os dias de gavagem foram determinados para assim serem comparados com estudos prévios realizados em nosso laboratório. Esses dias são baseados no período de desenvolvimento do rato, segundo Bernardi (1999) (Figura 1). O 10º dia está entre o período de organogênese, onde ocorre grande proliferação celular e formação de órgãos rudimentares, é também um período crítico para a formação de vários órgãos como olhos, palato, sistema urogenital e cérebro. O 15º dia pertence ao período de desenvolvimento fetal ocorrendo principalmente à diferenciação e maturação cerebral.

E no tratamento prolongado optou-se por iniciar a administração do extrato da *Passiflora nítida Kunth* no segundo dia gestacional e terminar no vigésimo dia, para evitar o estresse ocasionado pela manipulação em dias críticos para a gravidez, que poderiam levar a perda dos filhotes e induzir o trabalho de parto.

Os reflexos e as respostas de um recém nascido permite que ele reaja ao ambiente em que vive. Esses reflexos são instintivos, servem para protege-lo e todos os filhotes nascem com os mesmos reflexos. Por outro lado, as respostas são totalmente individuais. Os reflexos são respostas específicas, previsíveis e involuntárias a um tipo específico de estímulo(Ricci, 2010).

A maturação pós-natal da atividade motora do rato ocorre através dos seguintes processos comportamentais: desenvolvimento da postura e locomoção quadrúpede, dos ajustes dinâmicos posturais, de algumas respostas de orientação e de habilidades motoras complexas. O reflexo de preensão palmar é um reflexo medular que envolve respostas motoras do animal, sendo um dos poucos reflexos que diminuem com o desenvolvimento do animal. Este é o único reflexo que com o passar do tempo desaparece . (Dorce, 2006)

O reflexo de endireitamento ou postural é medido pelo tempo que um animal, colocado apoiado sobre as costas, consegue voltar à posição original. Animais recém-nascidos demoram cerca de 3 minutos para voltarem à posição normal e à medida que o mesmo desenvolve-se, o tempo necessário para a sua execução diminui gradativamente (Dorce, 2006).As reações de geotaxia compreendem respostas de girar a cabeça para cima quando os animais são colocados em um plano inclinado com a cabeça para baixo. No 5º dia de vida, filhotes de ratos são capazes de girar todo o corpo em um ângulo de 180° e a partir deste dia o tempo necessário para que o reflexo ocorra diminui gradativamente (Alteman; Sudarshan, 1975).Os reflexos de geotaxia negativa e postural refletem as funções do sistema vestibular,

dependendo de estruturas medulares que são as primeiras a chegar à maturidade (Dorce, 2006) estando envolvidas com a relação espacial dos animais.

Observou-se no Reflexo Postural (Figura 3) que todos os grupos tratados com o extrato apresentaram retardo significativo em relação ao controle; Essa diferença apareceu no 10º dia de vida nos filhotes do Grupo 2 e 3 e no 6º dia nos filhotes do Grupo 4 (Tabela 2, 4 e 7). O reflexo do endireitamento esta ligado a propriocepção (Fox, 1967) e os presentes dados indicam que esse aspecto do desenvolvimento foi alterado de forma significativa pela administração do extrato da *Passiflora nítida* Kunth. Por outro lado, o reflexo de Geotaxia Negativa(Figura 4) que expressa a esterocepção do animal (Chiavegatto; Oliveira; Bernardi, 1997) não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle o que leva a conclusão que a administração do extrato não interfere com a relação espacial do animal. Além de sugerir a não interferência de maneira significativa sobre as funções do sistema vestibular

Em relação ao reflexo de Preensão Palmar (Figura 2) observou-se que nos filhotes de mães do Grupo 2 e do Grupo 4 apresentaram redução no reflexo em relação ao grupo controle. Houve uma diminuição na latência para a ocorrência do reflexo no 8º dia de vida dos filhotes do Grupo 2 e no 6º e 8º dia nos filhotes do Grupo 4(Tabelas 1 e 6). O que indica uma possível maturação e desenvolvimento nos nervos que conectam a medula espinal ao cérebro (o trato corticoespinal)(Ricci, 2010).

Em relação aos parâmetros do desenvolvimento dos filhotes de mães tratadas comparados ao grupo controle, observou-se que o desdobramento das orelhas, erupção dos dentes incisivos, abertura do orifício do ouvido e abertura dos olhos não foram modificados pelo extrato. No entanto cambem aqui alguns de forma resumida alguns comentários à cerca da natureza de cada um desses parâmetros. A abertura dos olhos e erupção dos dentes

incisivos depende basicamente da presença do fator de crescimento epidérmico (EGF), sendo caracterizado como fator promotor de diferenciação celular dos tecidos epidérmico. A facilitação para a abertura dos olhos e erupção dos dentes tem origem epidérmica. Esses fatores são polipeptídeos que regulam a proliferação e/ou a diferenciação celular. Vários desses fatores já foram identificados e caracterizados nestes últimos anos e suas ações estão envolvidas com diferentes processos fisiológicos tais como crescimento, reparação, diferenciação e desenvolvimento de populações específicas de células recebendo, em geral, o nome de acordo com sua atividade específica. Foi demonstrado que esse fator está envolvido também com o desdobramento das orelhas. (Ricci, 2010);

Quanto a pesagem dos filhotes foi observado um aumento de peso no 12º dia de vida dos filhotes fêmeas de mães do Grupo 3 e uma diminuição do peso dos filhotes machos no 2º dia de vida. Uma possível explicação para o efeito de aumento de peso no 12º dia de vida dos filhotes poderia ser um aumento de peso dos órgãos afetado pelo extrato, visto que em algumas ninhadas foi observado que na região correspondente a dos rins apresentava-se bem edemaciada quando comparados com o grupo controle. Até o momento, não há estudos sobre o efeito do extrato da *Passiflora nítida* Kunth sobre aumento de peso nos órgãos. Somente estudos específicos poderiam comprovar esse relacionamento. Já em relação à redução corporal nos filhotes machos no 2º dia, a literatura remete a 2 prováveis hipóteses negligência materna ou alterações comportamentais da mãe e o efeito do tratamento experimental sobre as funções da placenta. Durante a administração do extrato duas fêmeas não reagiram bem a gavagem, ficaram sonolentas e pouco ativas. Diante disto, propõe-se que nos protocolos de estudo do desenvolvimento a inclusão de testes de avaliação do comportamento materno para dirimir algumas dúvidas que possam ser de natureza relativa à interpretação materno-filhote ou de ações diretas ou indiretas do agente tóxico.(Ricci, 2010).

Na prole de mães tratada de maneira prolongada (Grupo 4) houve um aumento do peso de filhotes fêmeas e machos no 12º dia de vida. Fride e Weinstock (1984) relacionaram aumento de peso fetal com estresse durante a gestação em ratos. Propõe-se a realização de estudos como o de dosagens de fatores de crescimento e citoxinas, para a verificação da relação do aumento do ganho de peso corpóreo com a administração do extrato.

6- CONCLUSÃO

De modo geral, a administração do extrato da *Passiflora nítida* Kunth na dosagem de 50mg/kg de maneira prolongada em ratas prenhes e de 150mg/kg no 10º e 15º dia gestacional causam alterações do desenvolvimento físico e comportamental das proles. Os estudos agora desenvolvidos não são suficientes para determinarmos se estas alterações são de caráter deletério ou não para os filhotes durante toda sua vida. Estudos posteriores poderão responder a esse questionamento.

REFERÊNCIAS

- BERNARDI, M. M. Exposição aos elementos durante o período perinatal. In: SOUZA-SPINOZA, H; GÓRNIK, S. L. AND BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999, p. 566-574.
- CARVALHO, M.J., Dissertação de Mestrado: "Caracterização fitoquímica e atividades farmacológicas de extratos das folhas do maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth)", Universidade Federal do Amazonas, Mestrado em Patologia Tropical, 2008.
- CARVALHO, M.J., PEDROSA, T.N., GUILHON-SIMPLÍCIO, F., NUNEZ, C.V., OHANA, D.T., PEREIRA, M.M., LIMA, E.S., Estudo farmacognóstico e atividade in vitro sobre a coagulação sanguínea e agregação plaquetária das folhas de *Passiflora nitida* Kunth (Passifloraceae). *Acta Amazonica*, 40 (1), 199-206, 2010.
- CASTRO, V. L.; PALERMO-NETO, J. Alterations in the behavior of young and adult rats exposed to Aldrin during lactation. *The Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 21, p. 987-990, 1988.
- CECHINEL-FILHO V., YUNES R.A., Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21 (1), 99-105, 1998.

CHIAVEGATTO, S; OLIVEIRA, C.A; BERNARDI, M.M; Prenatal exposure of rats to diphenhydramine:effects on physical development, open field, and gonadal hormone levels in adults. **Neurotoxicology and teratology**, v. 19, p.511-516,1997.

CRUTTENDEN, K. Exposição pré natal da mãe ao veneno do escorpião *Tityus serrulatus*: efeitos na prole de ratos. São Paulo, 2003, 84 p. Tese (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

DHAWAN, K.; SHARMA, A.. Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. *Fitoterapia*, v. 73, n. 5, p. 397-9, 2002.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A.. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

DHAWAN, K.; SHARMA, A.. Restoration of chronic- D9-THC-induced decline in sexuality in male rats by a novel benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linn. *British Journal of Pharmacology*, v. 138, n. 1, p. 117-120, 2004.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; GONZALES, F.G.;PORTILHO, W. G. Violaes
medicinais. In: DI Stasi, Luiz Claudio; Hirumalima,Clélia Akiko. Plantas medicinais na
Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: Editora da UNESP, 2002.

DORCE, Ana Letícia. Exposição pré-natal da mãe ao veneno do escorpião *Tityus bahiensis*: efeitos
na prole de ratos no período pós-natal e na vida adulta. São Paulo, 2006, Tese(mestrado).
Instituto Butantan.

FRANKOVÁ, S. Maternal behavior in females of the laboratory rat selected for high and low activity
and defecation rates. *Actv. Nerv. Sup.*, v. 27, p. 186-198, 1985.

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. ***Animal Behavior***, v.13, p-
234-241, 1965.

FRIDE, E.; WEINSTOCK, M. The effects of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress
on early developmental in the rat. *Developmental Psychobiology*, New York, v. 17, p. 651-
660, 1984.

HOPKINS,M. J. G.; SOUZA, M. A. D., Passifloraceae. In Ribeiro, J. E. L. S.; Hopkins, M. J. G.;
Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. S.; Brito, J. M.; Souza, M. A. D.;Martins, L. H. P.;
Lohmann, L. G.; Assunção, P. A. C. L.;Pereira, E.C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.;Procópio,

L. C., Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999.

LAZARINI, C.A.. Efeitos da exposição materna pré- natal à deltametrina sobre o desenvolvimento pré e pós- natal e toxicidade tardia da prole de ratos. São Paulo, 1997 Tese (Doutorado)- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

LEMONICA, I. P. Embriofetotoxicidade. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu Editora, 1996. P. 85-94.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora, 27 (1/2), 33-39, 2008.

MANSON, J. M. KANG, Y. J. Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: HAYES, A. W. Principles and Methods of Toxicology. Raven Press, Ltda. New York, 1989, p. 311-358.

MONTANARI, C.A; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. Quím. Nova vol.24 no.1 São Paulo Jan./Fev. 2001

NASELLO, A. G. Metodologia para estudos de toxicologia perinatal. *Biológico*, v.59, n. 2, p. 45-48, 1997.

OECD, 2001. GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Proposal for Updating Guideline 414. Prenatal Developmental Toxicity Study.

PALERMO-NETO, J.; FLÓRIO, J. C.; SAKATE, M. Developmental and Behavioral Effects of Prenatal Amitraz Exposure in Rats. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 16, n. 1, p. 65-70, 1994.

PINN G 2001. Adverse effects associated with herbal medicine. *Australian Family Physician* 30:1070-1075.

RICCI, Esther Lopes. Estudo de neuroteratologia em ratos: efeitos da restrição alimentar e da monocrotalina/ Esther Lopes Ricci. São Paulo. 2010. Dissertação (Mestrado).

SILVEIRA, P.F., BANDEIRA, M.A.M., ARRAIS, P.S.D., Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18 (4), 618-626, 2008.

WALTON, K. D.; LIEBERMAN, D.; LLINÁS, A.; BEGIN, M.; LLINÁS, R. R. Identification of the critical period for motor developmental in neonatal rats. *Neuroscience*, v. 51, 4: p. 763-767, 1992.

CERTIFICADO CEUA



The image shows a certificate from the Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) of UFAM. At the top left is the coat of arms of Brazil, and at the top right is the UFAM logo. The text in the header reads: "Poder Executivo, Ministério da Educação, Universidade Federal do Amazonas, Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA". The main title is "CERTIFICADO". The body text certifies that project 004/2013-CEEA/UFAM, titled "Efeitos do tratamento com o extrato da *Passiflora nitida Kunth* no período perinatal", is approved by the CEEA-UFAM committee on July 15, 2013, under the supervision of Prof. Dra. Geane Antiques Lourenço. The certificate is signed by Prof. Dra. Cinthya Lemille Fritsch Brandão de Oliveira, Director in exercise of the Central Veterinary Clinic of UFAM, on April 30, 2013.

Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA

UFAM

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 004/2013-CEEA/UFAM, intitulado como "Efeitos do tratamento com o extrato da *Passiflora nitida Kunth* no período perinatal" sob responsabilidade e orientação de **Prof. Dra. Geane Antiques Lourenço**, está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em Reunião ocorrida em 03/07/2013.

Manaus, 15 de julho de 2013.

Cinthya Lemille Fritsch Brandão de Oliveira
Prof. Dra. Cinthya Lemille Fritsch Brandão de Oliveira
Diretora em exercício do Biotério Central da UFAM
Portaria 1561/2013- Gabinete da Reitoria, de 30 de abril de 2013