MARIA IZABEL DA SILVA MATTOS

**Avaliação dos potenciais efeitos de toxicidade sub-aguda, de
teratogenicidade e imunotoxicidade da *Cynara scolymus* (alcachofra):
estudo em ratos**

SÃO PAULO

2014

MARIA IZABEL DA SILVA MATTOS

**Avaliação dos potenciais efeitos de toxicidade sub-aguda, de
teratogenicidade e imunotoxicidade da *Cynara scolymus* (alcachofra):
estudo em ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Silvana Lima Górnaiak

De acordo: _____

Prof^a. Dr^a. Silvana Lima Górnaiak

SÃO PAULO

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2995 FMVZ	<p>Mattos, Maria Isabel da Silva Avaliação dos potenciais efeitos de toxicidade sub-aguda, teratogenicidade e imunotoxicidade da <i>Cynara scolymus</i> (alcachofra): estudo em ratos / Maria Isabel da Silva Mattos. – 2014. 123 f. : il.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada. Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górniak.</p> <p>1. <i>Cynara scolymus</i>. 2. Imunotoxicologia. 3. Teratologia. I. Título.</p>
----------------	--

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos potenciais efeitos de toxicidade sub-aguda, de teratogenicidade e imunotoxicidade da *Cynara scolymus* (alcachofra): Estudos em ratos", protocolado sob o nº 2160/2011, utilizando 400 (quatrocentos) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Evaluation of potential effects of sub-acute toxicity teratogenicity and immunotoxicity of *cynara Scolymus* (artichoke): Studies in rats", protocol number 2160/2011, utilizing 400 (four hundred) rats, under the responsibility Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2014.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MATTOS, Maria Izabel da Silva

Título: Avaliação dos potenciais efeitos de toxicidade sub-aguda, de teratogenicidade e imunotoxicidade da *Cynara scolymus* (alcachofra): estudo em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu lindo filho, Enzo, pelos incontáveis dias e horas em que o deixei para me dedicar a este trabalho; pelo eterno amor incondicional

Ao meu marido, Leandro, pela compreensão e força desta imensa dedicação para a realização de um grande sonho em minha vida... pela força nos momentos mais difíceis desta grande empreitada... pelo amor e carinho dedicados à nossa família

Aos meus pais, Antonio e Wilma, por terem me ensinado a sempre correr atrás dos nossos sonhos e nunca desistir...

Aos meus irmãos, Cristina e Marcos, pelos momentos de alegria, companheirismo e grande amizade

Ao meu cunhado, Eduardo, pelas risadas e momentos de descontração; e ao meu sobrinho Fernando, que ama tanto os animais e quem sabe ainda um dia, chegará aqui como eu cheguei

AMO TODOS VOCÊS!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me dar força e saúde para a realização de mais um sonho...

À minha família pelo amor e compreensão em todos os momentos...

À Prof. Dra. Silvana Lima Górnaiak, pela orientação neste trabalho, por ter sido fundamental no meu crescimento científico; pela ajuda e grande paciência...

Às minhas amigas, que sempre estarão em meu coração:

- Beatriz Dorr Caniceiro, pela ajuda, pelas “broncas”, pelas risadas... você é um grande exemplo de amor pela pesquisa!!
- Aline Ameni, pelas conversas, viagens divertidas e grandes idéias... a vida realmente é mais interessante do seu modo de vista e com sua presença...seja sempre assim!!
- Thaísa, pela ajuda, sempre disposta a colaborar, pelas risadas e companheirismo...você é realmente muito amiga!!
- Mariana Sayuri, por toda a ajuda, nas piores horas do dia...pelas risadas e pela sua amizade...

Aos colegas da pós, pelas ótimas conversas e desabafos naquela “salinha da pós” e pela ajuda: Gabriela, Fernando, Thiago e Natália.

À todos do biotério, Dna Idalina, Luciana, Aline, Cláudia e Mauro...pelos cuidados aos animais e com carinho e dedicação...

À todos do laboratório de Farmacologia: Vagner, Herculano e Nicolle....excelentes profissionais e amigos.

Aos funcionários do laboratório de Histologia, Cláudio e Luciano, pela ajuda na confecção das lâminas estudadas.

Aos grandes vizinhos, Ronnie e Karina, pela ajuda nos momentos finais.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida durante a realização deste trabalho.

RESUMO

MATTOS, M. I. S. **Avaliação dos potenciais efeitos de toxicidade sub-aguda, de teratogenicidade e imunotoxicidade da *Cynara scolymus* (alcachofra): estudo em ratos.** [Evaluation of potencial sub-acute toxicity, teratogenicity and immunotoxic effects of the *Cynara scolymus* (Artichoke): study in rats]. 2014. 123f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A *Cynara scolymus*, popularmente conhecida como alcachofra, é uma planta hepatoprotetora com função colerética e colagoga. O extrato de *C.scolymus* foi recentemente liberado para a confecção de medicamentos fitoterápicos sem a necessidade de testes toxicológicos específicos, por ser uma planta utilizada há muito tempo e ter eficácia comprovada. Devido à falta de estudos sobre os efeitos dessa planta e por ela ser muito utilizada, o presente estudo visou avaliar os possíveis efeitos imunotóxicos, teratogênicos e de toxicidade geral do extrato seco da *Cynara scolymus*. O extrato seco da planta foi administrado a ratos Wistar adultos, machos e fêmeas, nas doses de 1, 2 e 4g/Kg, por gavagem, durante 28 dias, de acordo com o protocolo de testes de toxicidade da OECD – *Organization for Economic Co-operation and Development*, para avaliação de toxicidade geral e imunotoxicidade. Foi avaliado o ganho de peso, consumo de alimento e água, os órgãos linfóides e a fenotipagem de suas células; a atividade de fagócitos, as respostas imunes humoral e celular e a atividade proliferativa de linfócitos também foram avaliados. No estudo da teratogenicidade, ratas prenhes receberam as mesmas doses do extrato seco de *C.scolymus* do 6º ao 19º dia de gestação. Avaliou-se o tamanho, peso, viabilidade e malformações externas dos fetos, bem como procedeu-se à análise óssea e visceral. O presente estudo revelou que o extrato de alcachofra não promoveu toxicidade geral nos ratos adultos tratados subagudamente; por outro lado, o extrato seco de *C.scolymus*

promoveu aumento no peso relativo e celularidade do baço, aumento no peso relativo dos rins, diminuição na celularidade do timo e diminuição no DTH – *Delayed-type hypersensitivity* . Apesar disso a análise destes dados em conjunto não permite sugerir efeito imunotóxico dessa planta. O estudo da teratogenicidade mostrou que fêmeas gestantes tratadas com a *C.scolymus* apresentaram diminuição no ganho de peso; além disso, foi observada diminuição do peso uterino e fetal, menor comprimento fetal e queda do número de fetos vivos por ninhada. Assim, pode-se sugerir que embora a alcachofra não apresente toxicidade geral, nem efeito imunotóxico, não deve ser utilizado durante a gestação, tendo em vista que foi observada toxicidade fetal.

Palavras-chave: *Cynara scolymus*. Imunotoxicologia. Teratologia.

ABSTRACT

MATTOS, M. I. S. **Evaluation of potencial sub-acute toxicity, teratogenicity and immunotoxic effects of the *Cynara scolymus* (Artichoke): study in rats.** [Avaliação dos potenciais efeitos de toxicidade sub-aguda, de teratogenicidade e imunotoxicidade da *Cynara scolymus* (alcachofra): estudo em ratos]. 2014. 123 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Cynara scolymus, commonly known as artichoke, is popular used as hepatoprotectant, choloretic and colagogue agent. The *C.scolymus* extrat was recently approved by Brazilian regulatory agency, for production of phytotherapeutic drugs, without toxicological tests, because it has been considered both harmless and effective. Due to lack of toxicological studies and its widely usage, the aim of this study is evaluate the immune system and the teratogenic effects as well as the general toxicity of *C. scolymus* extracts. Therefore, the extract was administered to adult male and female Wistar rats by gavage at 1, 2 and 4g/Kg doses for 28 days, according to the OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) protocols. Body weight gain, food and water consumption, lymphoid organs and their cell phenotype were evaluated as well as the phagocyte analysis, humoural and cellular immune responses, and lymphocyte proliferation. In teratogenic study, pregnant rats received the same doses of *C.scolymus* extract from the 6th to the 19th gestational day. Fetuses' size, weight, viability and external malformations were evaluated and subjected to bone and visceral analysis. The present study showed that *C. scolymus* extracts did not promote sub-acute toxicity in adult rats; however, the relative spleen weight and it cellularity were increased just as the kidney weight, but the thymus cellularity and DTH (*Delayed-type hypersensivity*) decreased. None of those results represent immunotoxic effect. The teratogenic study showed a decrease of body weight gain, uterus weight,

fetal weight and number of fetuses, in practically all doses of the extract. Thus, these results showed that the *C. scolymus* extract is not toxic or immunotoxic but should not be used in pregnancy, due to fetal toxicity.

Keywords: *Cynara scolymus*. Immunotoxicology. Teratology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	BREVE HISTÓRICO SOBRE PLANTAS MEDICINAIS E SUA UTILIZAÇÃO NOS DIAS ATUAIS.....	17
2.2	SOBRE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS.....	19
2.3	FITOTERÁPICOS NO BRASIL: CONSIDERAÇÕES GERAIS E REGISTRO.....	20
2.4	SOBRE A <i>Cynara scolymus</i>	22
2.5	ALGUNS CONCEITOS BÁSICOS SOBRE O SISTEMA IMUNE.....	24
2.6	TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO.....	27
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	ANIMAIS.....	35
4.2	EXTRATO SECO DE <i>Cynara scolymus</i>	35
4.3	REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	35
4.4	PROCEDIMENTOS.....	36
4.4.1	Análise química do extrato seco de <i>Cynara scolymus</i>.....	36
4.4.1.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	37
4.4.2	Administração do extrato seco de <i>Cynara scolymus</i>.....	37
4.4.3	Avaliação do consumo de água, ração, mensuração do peso corpóreo e avaliação clínica.....	37
4.4.4	Avaliação do hemograma e bioquímica sérica.....	38
4.4.5	Avaliação do peso relativo do baço, timo, fígado, rim e celularidade do baço e timo.....	38
4.4.6	Necropsia e avaliação histopatológica de órgãos linfóides, adrenais, fígado, timo e rim.....	39
4.4.7	Fenotipagem dos linfócitos esplênicos, tímicos e do sangue periférico.....	39
4.4.7.1	Citometria de fluxo.....	40
4.4.8	Avaliação da proliferação de linfócitos T antígeno-específica por citometria de fluxo.....	40
4.4.8.1	Indução da resposta imune celular.....	40
4.4.8.2	A técnica.....	41
4.4.9	Avaliação dos neutrófilos presentes no sangue periférico e de macrófagos peritoneais através da medida de “burst” oxidativo e fagocitose por meio de citometria de	

fluxo.....	41
4.4.10 Titulação de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (anti SRBC).....	43
4.4.10.1 Preparação dos eritrócitos de carneiro (SRBC).....	43
4.4.10.2 A técnica.....	43
4.4.11 Avaliação da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH).....	44
4.4.12 Acasalamento e diagnóstico de prenhez.....	45
4.4.13 Administração do extrato seco de <i>Cynara scolymus</i> durante a gestação.....	45
4.4.14 Avaliação do peso corpóreo, consumos de água e ração e avaliação clínica das ratas gestantes.....	45
4.4.15 Cesariana.....	46
4.4.16 Análise dos fetos no 20º dia de gestação.....	46
4.4.17 Análise visceral e óssea dos fetos.....	46
4.4.17.1 Análise visceral.....	46
4.4.17.2 Análise óssea.....	47
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	49
5.1 EXPERIMENTO 1: ANÁLISE QUÍMICA DO EXTRATO DE <i>C. scolymus</i>	49
5.1.1 Delineamento experimental.....	49
5.1.2 Resultados.....	49
5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO, CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO, PESO RELATIVO DO BAÇO, TIMO, FÍGADO, RIM, CELULARIDADE DO BAÇO E DO TIMO E ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES, FÍGADO, RIM E ADRENAIS EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO DE <i>C. scolymus</i> , EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS.....	52
5.2.1 Delineamento experimental.....	52
5.2.2 Resultados.....	52
5.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO SECO DE <i>C. scolymus</i> , EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS.....	62
5.3.1 Delineamento experimental.....	62
5.3.2 Resultados.....	62
5.4 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T ANTÍGENO-ESPECÍFICA EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO SECO DE <i>C. scolymus</i> , EM	

	DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS.....	67
5.4.1	Delineamento experimental.....	67
5.4.2	Resultados.....	67
5.5	EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS PRESENTES NO SANGUE PERIFÉRICO E DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS ATRAVÉS DA MEDIDA DE “BURST”OXIDATIVO E FAGOCITOSE POR MEIO DE CITOMETRIA DE FLUXO, EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO SECO DE <i>C. scolymus</i> , EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS.....	69
5.5.1	Delineamento experimental.....	69
5.5.2	Resultados.....	69
5.6	EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR ATRAVÉS DA TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SRBC (SHEEP RED BLOOD CELS) EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO SECO DE <i>C.scolymus</i> , EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS.....	71
5.6.1	Delineamento experimental.....	71
5.6.2	Resultados.....	71
5.7	EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR POR MEIO DA REAÇÃO TARDIA (DELAYED TYPE HYPERSENSIVITY – DTH) EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO SECO DE <i>C. scolymus</i> , EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS.....	73
5.7.1	Delineamento experimental.....	73
5.7.2	Resultados.....	73
5.8	EXPERIMENTO 8: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO SECO DE <i>C. scolymus</i> , À RATAS GESTANTES: ESTUDO DOS POSSÍVEIS EFEITOS TÓXICOS NA MÃE E NOS FETOS DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL.....	75
5.8.1	Delineamento experimental.....	75
5.8.2	Resultados.....	76
6	DISCUSSÃO.....	86
7	CONCLUSÕES.....	103
	REFERÊNCIAS.....	105
	ANEXOS.....	124

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas para o tratamento de diversas doenças pela humanidade há milhares de anos. Nos últimos anos, tem havido um aumento cada vez maior do interesse da população em substituir os medicamentos farmacêuticos por plantas, devido ao alto custo e aos efeitos adversos produzidos por estes, gerando, dessa forma, um grande interesse em estudos para o isolamento de substâncias ativas dos extratos vegetais para a produção de medicamentos com bases “naturais”, os denominados fitoterápicos.

Apesar da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, ainda são necessários mais estudos para comprovação da sua eficácia e segurança, que apenas tem o uso tradicional e os conhecimentos populares como garantia. De fato, em maio deste ano, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2014) determinou que produtos rotulados como “fitoterápicos tradicionais” fossem reconhecidos sem a necessidade de pesquisas, porque os efeitos medicinais já são consagrados pela população. Portanto, o critério para o uso desses medicamentos está embasado na “sabedoria popular” e não na ciência.

Dentre os fitoterápicos relacionados pela ANVISA está a *Cynara scolymus* (alcachofra), a qual vem sendo utilizada no Brasil como colerética e colagoga (GEBHARDT, 1998) e também como antioxidante (RUNJAIC-ANTIC; PAVOKV; LEVIC, 2010). Existe uma grande variedade de medicamentos à base de extrato de *C.scolymus* nas prateleiras das farmácias à disposição para venda com diferentes finalidades, sendo que suas folhas também são utilizadas por apresentarem efeito diurético (CARVALHO, GOSMANN; SCHENKEL, 2004).

Existem diversos trabalhos sobre a *C. scolymus* para elucidar e confirmar seus efeitos no sistema digestivo; porém, a literatura carece de estudos sobre a avaliação de toxicidade, não sendo encontrado nenhuma pesquisa com este propósito no que se refere ao sistema imunológico, bem como sobre seu uso durante a gestação. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos produzidos pela administração do extrato seco de *C. scolymus*, em diferentes doses, sobre o sistema imune em ratos adultos, machos e fêmeas e também em fêmeas tratadas durante a gestação e seus efeitos em neonatos.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BREVE HISTÓRICO SOBRE PLANTAS MEDICINAIS E SUA UTILIZAÇÃO NOS DIAS ATUAIS

Desde a antiguidade, as plantas têm sido um recurso ao alcance do ser humano. Por muito tempo, o homem tentou aprofundar seus conhecimentos com intuito de melhorar as condições da sua alimentação e a cura de suas enfermidades, demonstrando uma estreita relação entre o uso das plantas e sua evolução (MIGUEL; MIGUEL, 2004).

As primeiras descrições sobre plantas medicinais foram feitas pelos mesopotâmios e egípcios datando de mais de 4000 anos a.C., com a utilização da *Papaver somniferum*, o ópio, para alívio da dor. O Papiro de Ebers, (nome dado em homenagem a Georg Ebers (1837-1898), quem os adquiriu em 1875), um dos tratados médicos mais importantes da antiguidade, datado de 1550 a.C., possui mais de 20 metros de comprimento e inclui referência superior a 7000 substâncias medicinais incluídas em aproximadamente 800 fórmulas (PINTO; SILVA; BOLZANI, 2002).

Durante o período anterior à era cristã, vários filósofos podem ser destacados por suas obras sobre história natural. Dentre eles, sobressaem-se Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que se caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios (*Natura medicatrix*) e Teofrasto, discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história das plantas. Já no século I da era cristã, o médico grego Dioscórides, escreveu uma obra intitulada “Matéria Medica”, que serviu como guia de ensino nestas áreas até a época do Renascimento. No século seguinte, Claudius Galeno (130-200 d.C.), farmacêutico e médico grego, foi autor de vários livros sobre medicina e farmácia e que, a partir de suas formulações medicamentosas, deu origem à farmácia galênica (PINTO; SILVA; BOLZANI, 2002). Já a “*Histoire générale des Drogues*”, publicado em 1673 pelo farmacêutico Pierre Pomet, mostra o estudo das plantas bem como a classificação e a descrição taxonômica para uma identificação segura (CUNHA, 1999).

Segundo Carvalho et al. (2007), até o século XIX, os recursos terapêuticos se baseavam em plantas e extratos vegetais e somente depois da revolução industrial é que

iniciou-se o estudo da química orgânica e o desenvolvimento de técnicas para o isolamento dos princípios ativos presentes nas plantas; estes passaram a ser mais utilizadas do que os extratos vegetais, devido à sua maior eficácia, maior segurança e principalmente, por se tratar de uma substância única além da facilidade de estabelecer especificações em relação à mistura de componentes que estão presentes nos extratos vegetais.

A partir dos anos 1980, o desenvolvimento de novas técnicas para o isolamento de substâncias ativas, oriundas dos extratos vegetais, permitiu maior rapidez e a identificação mais detalhada do conteúdo destes extratos; novas substâncias isoladas, aliadas ao aumento no consumo da população pelos produtos naturais, desencadearam um interesse maior da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

A própria Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que o conhecimento tradicional sobre produtos da biodiversidade é um instrumento importante no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos para o combate a doenças presentes nas populações dos países em desenvolvimento. Vale ressaltar que, a opção de conduzir pesquisas com a utilização de plantas, já conhecidas pelas pessoas, encurta o percurso do desenvolvimento de um novo medicamento sintético, já que os pesquisadores dispõem, antes mesmo de iniciarem os estudos científicos, de uma indicação de qual atividade esta substância poderia apresentar (FUNARI; FERRO, 2005).

Atualmente, a utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo, de grande aceitação pela população, e vem crescendo, junto à comunidade médica, principalmente com a utilização de plantas, cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; KINGHORN, 2001). Como a maioria da população nem sempre tem acesso a medicamentos industrializados, a ação terapêutica inegável das plantas, aliado ao baixo custo, tornam-se motivos suficientes pelos quais profissionais da área da saúde e órgãos governamentais se voltem para a importância dos estudos e uso de plantas medicinais como tratamento de determinadas doenças (SIMÕES, 1998).

Por outro lado, deve-se considerar que ao contrário da crença popular, o uso de plantas medicinais não é isento de riscos porque uma mesma planta pode conter, além de seus princípios ativos benéficos, substâncias tóxicas, contaminação por agrotóxicos ou até

mesmo por metais pesados, substâncias capazes de produzir algum tipo de reação, inclusive alergias e também, não se pode esquecer do risco de interações medicamentosas (CHAN, 2005). Ainda, deve-se ponderar que mesmo um princípio ativo que pode ser útil no tratamento de uma determinada afecção, se estiver presente na planta em quantidades elevadas, poderá causar intoxicação e mesmo morte; e, se o contrário ocorre, ou seja, se houver baixas concentrações deste princípio ativo, o medicamento torna-se ineficaz, podendo comprometer sobremaneira a recuperação do paciente.

2.2 SOBRE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

Considera-se uma planta medicinal aquela que quando administrada ao homem, sob qualquer forma ou via, exerce algum tipo de ação farmacológica benéfica. Estes vegetais podem ser classificados de acordo com sua ordem de importância: as plantas empregadas diretamente na terapêutica; as que constituem matéria-prima para manipulação e aquelas empregadas na indústria para obtenção de princípios ativos (FOGLIO et al., 2006). O termo “planta medicinal” foi oficialmente reconhecido em 1978, durante a 31ª Assembléia da Organização Mundial da Saúde - OMS (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Fitoterapia (do grego *phyton* = vegetal e *therapeia* = tratamento) é o tratamento de doenças mediante o uso de plantas. Já um medicamento fitoterápico é obtido a partir de plantas ou partes das plantas com propriedades medicinais e são considerados então, produtos industrializados. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a ANVISA (BRASIL, 2004a), “plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade” e um “fitoterápico é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade; sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3”. Vale ressaltar que não é considerado um medicamento fitoterápico aquele que inclua

substâncias ativas isoladas e nem a associação destas com extratos vegetais (CARVALHO et al., 2008).

Os medicamentos fitoterápicos podem ser comercializados na forma de líquido (extratos fluidos), sólidos (extratos secos) ou semi-sólidos (extratos moles), obtidos de extratos padronizados, preparados normalmente por maceração ou destilação. Os extratos fluidos são normalmente extraídos ou misturados com etanol e com água; nos extratos sólidos e moles, os solventes são evaporados e processados até a secura (SIANI, 2003). Além dos extratos, existem as tinturas, que são preparações alcoólicas ou hidro alcoólicas; os xaropes, emulsões e loções, pomadas, cremes e géis, cápsulas, drágeas ou comprimidos (CARVALHO, 2004).

Segundo Calixto (2000), muitos fatores podem influenciar na qualidade de um fitoterápico; dentre eles, pode-se citar a variabilidade no próprio metabolismo vegetal, que produz diferenças na composição química em diferentes doses vegetais; idade e parte da planta utilizada, condições de plantio e de coleta, exposição à luz ou altas temperaturas e métodos de extração, por exemplo. Desta forma, para garantir a qualidade de um extrato é necessário isolar um componente dele que seja quantificável e responsável pela atividade farmacológica; determinar os princípios ativos ou estabelecer marcadores químicos, fundamentais para o desenvolvimento, a padronização e o controle de qualidade dos fitoterápicos (RIBEIRO, 2000). O marcador químico pode ser definido como o componente ou o conjunto de componentes relacionados ao efeito terapêutico, utilizado como referência para a padronização dos fitoterápicos e como controle de qualidade da própria matéria-prima vegetal destes medicamentos (BRASIL, 2004a).

O controle de qualidade, a padronização e a estabilização dos medicamentos fitoterápicos são realizados através de métodos analíticos de alta resolução, como a cromatografia, a espectrometria e ressonância magnética. Essas técnicas permitem, por exemplo, isolar e identificar os constituintes químicos presentes no material vegetal, garantindo a eficácia terapêutica e sua qualidade (SIANI, 2003).

2.3 FITOTERÁPICOS NO BRASIL: CONSIDERAÇÕES GERAIS E REGISTRO

O Brasil é o país que possui a maior biodiversidade do mundo, com aproximadamente 20% do número total de espécies do planeta (PINTO et al., 2002). Com a maior flora diversa mundial, o uso de fitoterápicos e derivados vegetais pela população é muito tradicional e antiga.

O Ministério da Saúde publicou em 2008, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse (RENISUS) ao Sistema único de Saúde (SUS), constituída de espécies vegetais que teriam a capacidade de gerar produtos que poderiam ser utilizados pela população atendida pelo SUS. A RENISUS subsidia todas as ações relacionadas à regulamentação, cultivo e manejo, produção e comercialização de fitoterápicos, além de orientar estudos e pesquisas para a elaboração da “Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RENAFITO)” (RENISUS, 2009).

Em 2008, foi publicada pela ANVISA, uma autarquia federal, responsável pela regulamentação dos medicamentos fitoterápicos industrializados no Brasil, uma lista de medicamentos fitoterápicos que contém várias espécies vegetais de eficácia clínica comprovada por estudos científicos, para serem utilizados pela população. Entretanto, várias plantas contidas nesta lista requerem avaliações toxicológicas mais apuradas (BRASIL, 2008).

Todos os fitoterápicos industrializados devem ser registrados na ANVISA antes de sua comercialização, para garantir segurança à população na utilização desses medicamentos (CARVALHO et al., 2008). Para garantir esta segurança, a ANVISA tem a função de publicar resoluções com todos os requisitos necessários para garantir a qualidade do medicamento.

Atualmente, a principal resolução da ANVISA, pertinente aos fitoterápicos, é a RDC nº 48/04, na qual são estabelecidos requisitos necessários, desde a avaliação da matéria-prima vegetal até o produto final, comprovando a eficácia e segurança no seu uso; os medicamentos que não se enquadram como fitoterápicos tradicionais, aqueles que já têm histórico de utilização e indicação, devem realizar ensaios de toxicologia pré-clínica e também, ensaios de farmacologia, para comprovação da eficácia terapêutica (CARVALHO et al., 2008). Esses ensaios de toxicologia pré-clínica deverão estar de acordo com a normatização da Resolução RE nº 90/04, “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” (BRASIL, 2004a).

A ANVISA atualizou o registro dos medicamentos fitoterápicos e criou o “Registro e Notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos”, que seriam medicamentos

fitoterápicos e produtos tradicionais que teriam seu registro simplificado na ANVISA. A RDC 26/14, publicada em 13 de maio de 2014, através da Instrução Normativa 2/14, publicado no Diário Oficial da União (DOU), define como será feito esse registro simplificado e lista 43 plantas, que são comumente utilizadas pela população e reconhecidas como seguras e eficazes, que poderão produzir medicamentos sem a necessidade de comprovação adicional de eficácia e segurança; a *Cynara scolymus* está presente nesta lista.

2.4 SOBRE A *Cynara scolymus*

A *Cynara scolymus* comumente conhecida como alcachofra, pertence à família Asteraceae/ Compositae e é cultivada por sementes, que formam rizomas. Deles brotam folhas grandes, largas e curvadas em forma de arco, com extremidades espinhosas. Sua floração exibida pelas colorações, azuis ou violáceas, ocorre no verão, ilustrado na figura 1 (NEUMANN, 2000). A *Cynara scolymus* é originária das regiões mediterrâneas e é considerada como uma planta perene, própria dos climas temperado-quentes, em que o solo ideal para cultivo é o sílico-argiloso-calcário, profundo, fértil e bem drenado (BALBACH, 1991; NEUMANN, 2000).

A alcachofra é uma das plantas medicinais mais antigas de que se tem conhecimento e por isto, foi muito cultivada nos jardins e palácios na Grécia antiga. No entanto, as primeiras descrições sobre suas propriedades medicinais só foram realizadas por Nilzaud em 1578 e de Bauderon em 1672. Na época do Renascimento, seu cultivo se tornou bastante popular pelos horticultores italianos e no início do século XVIII, diversos autores, entre eles Lemery, Alexandre e Lange-Murray, preconizaram o uso da alcachofra nos casos de icterícia e hidropsia (ALONSO, 1998).

No início do século XX, as pesquisas sobre as propriedades da alcachofra foram se intensificando, principalmente após os estudos de Leclerc (1928) e Brel (1930) que reiteraram as propriedades estimulantes do fígado aos extratos das folhas de *Cynara scolymus*, preconizadas pelos médicos do século XVIII. A partir daí, vários estudos foram realizados, por diversos pesquisadores. Em 1934, Desbordes e em 1939, Schonholzer pesquisaram basicamente, as possíveis interferências bioquímicas entre os extratos de alcachofra e o metabolismo hepático do colesterol (MARTELLONI, 2005), uma vez que

na medicina popular, é utilizada também como colerética e hipocolerolêmica (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996).

Figura 1: *Cynara scolymus*

Fonte: (www.culturamix.com).

Em relação aos componentes químicos da alcachofra, estes estão presentes principalmente em suas folhas e já estão bem caracterizados. São eles: flavonóides, sesquiterpenos e ácidos fenólicos, no qual se inclui a cinarina, o mais importante princípio ativo contido na planta e ao qual se atribui as propriedades medicinais (NOLDIN et al., 2003; GOETZ; LE JEUNE, 2007). A *C. scolymus* possui também ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, ácido cafeíco e quínico, entre outras substâncias (FRITSCHÉ et al., 2002). No entanto, os constituintes químicos de interesse terapêutico são encontrados nas folhas e raízes da planta, e para uso, são empregadas somente as folhas, que devem ser colhidas antes da floração (TESKE; TRENTINI, 1995; SIMÕES, 1999; NEUMANN, 2000).

Quanto aos sesquiterpenos, estudos revelaram a presença de cinaropicrina, grosheimina e cinarotriol (BERNHARD, 1982); a cinaropicrina é considerado o princípio responsável pelo gosto amargo da planta e também por estimular a secreção gástrica dos ácidos, responsáveis pela digestão, e é encontrada essencialmente nas extremidades das

folhas novas, cuja concentração pode chegar a 80% em princípios amargos, sendo que esta porcentagem decai com o amadurecimento da planta (SCHNEIDER; THIELE, 1974). Acredita-se que a presença destes compostos tem por finalidade básica a proteção desta espécie de planta de seus predadores (FREIRE; URTUBEY, 1999).

Além da *Cynara scolymus*, uma outra espécie do mesmo gênero, a *Cynara cardunculus* L., conhecida como cardo-santo, é muito semelhante à alcachofra e possui as mesmas ações terapêuticas atribuídas a esta planta (NEUMANN, 2000) e, por isso também vem sendo empregada com as mesmas finalidades medicinais.

Uma busca na literatura revela haver muito poucos estudos relativos à avaliação de toxicidade da alcachofra. Por outro lado, há citações de ocorrências de dermatite de contato alérgica ocasionada por esta planta e que poderia ser devido à presença das lactonas sesquiterpênicas, como a cinaropicrina (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). Além disto, um estudo realizado com as folhas de alcachofra cultivada na cidade de Curitiba, no estado do Paraná, verificou-se ser a cinaropicrina o componente majoritário; porém, alguns estudos com esta substância, indicaram possuir atividade neurotóxica (WANG et al., 1991; CHENG et al., 1992).

2.5 ALGUNS CONCEITOS BÁSICOS SOBRE O SISTEMA IMUNE

Um sistema de proteção contra qualquer patógeno, que possa representar uma ameaça à sobrevivência de animais e/ou mamíferos, é um requisito fundamental para uma defesa efetiva; isso seria o sistema imunológico, composto por elementos específicos e inespecíficos, que mobiliza uma série de estruturas, células e de secreções, para fornecer esta proteção (QUINN et al., 2005).

A imunidade inata ou inespecífica é considerada a primeira barreira à infecção, que oferece uma resposta rápida e indiscriminada, baseadas na atividade de células fagocitárias, como os macrófagos e neutrófilos, que combatem uma grande variedade de agentes; já a imunidade adaptativa ou específica é uma resposta baseada, por exemplo, na produção de anticorpos a um agente infeccioso específico, conferindo imunidade protetora contra reinfecções pelo mesmo agente infectante (QUINN et al., 2005).

Segundo Janeway-Jr e Travers (1997), tanto a imunidade inata como as respostas adaptativas dependem da atividade das células brancas do sangue, os leucócitos; no que se refere à imunidade inata, esta é amplamente mediada pelos granulócitos, assim chamados porque contém grânulos citoplasmáticos evidentes, e por macrófagos. Por outro lado, as respostas adaptativas são mediadas por linfócitos, que proporcionam a imunidade duradoura.

Há três tipos de granulócitos: os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos. Os neutrófilos são células fagocitárias, produtores de espécies reativas de oxigênio; os eosinófilos são importantes na defesa contra parasitas e os basófilos atuam na proteção de superfícies mucosas e liberam histamina nas reações alérgicas (JANEWAY-JR; TRAVERS, 1997).

Há dois tipos de principais de linfócitos: as células B que, quando ativadas, diferenciam-se em plasmócitos, capazes de secretar anticorpos; e linfócitos T, das quais se reconhecem duas classes principais: uma inclui as células T citotóxicas, que matam as células infectadas por vírus ou com outras alterações perceptíveis em sua membrana plasmática, e a outra as células T auxiliares, com função ativadora sobre linfócitos B e macrófagos (QUINN et al., 2005).

Na imunidade inata, existem os neutrófilos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e células *natural-killer* (NK); basófilos, eosinófilos e os neutrófilos estão nesse grupo de PMN que são células fagocíticas de vida curta, que contêm lisossomos ricos em enzimas para facilitar a destruição de microorganismos (JANEWAY-JR; TRAVERS, 1997).

Os macrófagos são fagócitos derivados dos monócitos do sangue, que migram para diferentes tecidos onde passam por uma diferenciação. Dependendo do órgão onde estão localizados recebem diferentes nomes como células de Kupffer no fígado; macrófagos alveolares no pulmão; macrófagos esplênicos na polpa branca do baço e células microgliais no sistema nervoso central. As suas principais funções são a remoção de bactérias e parasitas do corpo e a participação na interface entre a resposta imune inata e a adaptativa através da digestão parcial dos microorganismos e apresentação de seus antígenos para os linfócitos T, sendo também classificados como células apresentadoras de antígeno (APC) (TIZARD, 1985).

As células dendríticas (DC) são células também derivadas de precursores hematopoiéticos como os monócitos, mas permanecem na forma imatura nos tecidos; o contato direto dos patógenos com estas, levam à sua maturação e ao aumento da sua capacidade de apresentação de antígeno para os linfócitos T. As DC maduras podem ativar linfócitos T *helper naive* para linfócitos T *helper* efetores (Th1 ou Th2). As células Th1 têm a função de ativar macrófago, induzindo a neutralização e a expulsão do fagócito; as células Th2 ou células T auxiliares destroem as células infectadas e ativam os macrófagos, mas atuam principalmente na eliminação de agentes extracelulares ativando os linfócitos B e gerando a secreção de imunoglobulinas específicas (COICO; SUNSHINE; BENJAMINI, 2003).

As células NK são grandes linfócitos granulares que podem induzir a morte de células infectadas; esta pode ocorrer quando a célula alvo apresenta diminuição ou ausência da expressão do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe I, que é expresso na superfície de todas as células nucleadas normais. MHC de classe I pode exibir fragmentos de proteínas virais na superfície da célula, reconhecidos por linfócitos T auxiliares; MHC de classe II exibe peptídeos derivados de antígenos ingeridos por macrófagos ou internalizados pelas células B, reconhecidos por linfócitos T (PARHAM, 2001).

A imunidade adaptativa pode ser predominantemente humoral ou celular; a resposta humoral é mediada principalmente pelos linfócitos B e anticorpos circulantes; já a celular é mediada por linfócitos T, que de acordo com as moléculas específicas expressas em sua superfície são divididos em dois subtipos: linfócitos T *helper* (Th) ou T CD4⁺ e linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (JANEWAY-JR; TRAVERS, 1997).

Segundo Quinn et al. (2005), os linfócitos T *helper*, quando ativados, produzem muitas citocinas que aumentam as atividades de outras células do sistema imune, para torná-las mais efetivas; dependendo do tipo de antígeno, ocorre a estimulação do linfócito T *naive* para um outro tipo de célula efetora Th1, quando se trata de antígenos virais ou bactérias intracelulares, ou Th2, para antígenos de bactérias extracelulares, parasitas e toxinas; linfócitos T citotóxicos reconhecem células infectadas por vírus ou bactéria ou células mutantes, produzem perforinas e granzimas que levam esta célula alvo à apoptose. Assim, os linfócitos Th1 vão produzir citocinas inflamatórias que atuam sobre macrófagos aumentando sua atividade bactericida, ou seja, a ativação de linfócitos Th1 contribui para melhorar a resposta imune celular. Já os linfócitos Th2 produzem outras citocinas, como a

IL-4, que ativa os linfócitos B a produzirem mais anticorpos melhorando, então, a resposta imune humoral.

Os órgãos linfóides podem ser divididos em centrais (medula e timo), onde são gerados os linfócitos e os periféricos (baço e linfonodos), nos quais se iniciam as respostas adaptativas (QUINN et al., 2005).

Segundo Janeway-Jr e Travers (1997), linfócitos B e T surgem na medula óssea; os linfócitos B se diferenciam ali mesmo e os linfócitos T migram para o timo para amadurecer; depois da fase de maturação, os dois linfócitos entram na corrente sanguínea e migram para órgãos linfóides periféricos, como por exemplo, os linfonodos e o baço. Nos linfonodos, os linfócitos B se localizam em folículos, com as células T mais difusamente distribuídas em torno das áreas para-corticais; alguns dos folículos de células B contêm áreas centrais, denominadas centros germinativos, onde os linfócitos B se encontram sob intensa proliferação após seu encontro com o antígeno; já o baço representa o sítio de maturação dos linfócitos; em seu centro germinativo existem linfoblastos e pró-linfócitos B em diferenciação e na periferia, existem linfócitos maduros prontos a realizar alguma resposta imune, que podem sair para o sangue.

A principal função dos órgãos linfóides periféricos ou secundários é permitir a interação dos linfócitos com os antígenos carregados pela linfa, pelo sangue e células do sistema imunológico, que vão iniciar as respostas imunes adaptativas.

2.6 TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

A “Toxicologia do Desenvolvimento” está inserida dentro da toxicologia da reprodução e tem como objetivo o estudo dos efeitos nocivos causados por agentes tóxicos em um conceito em desenvolvimento (GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008). O termo toxicologia do desenvolvimento vem sendo empregado relativamente a pouco tempo, anteriormente denominava-se “teratologia”, termo esse proveniente do grego *teratos*, que significa monstro. O sentido original da palavra refere-se a malformações anatômicas macroscópicas, no entanto, atualmente esse conceito se expandiu, sendo que sua definição, nos dias de hoje, engloba também anomalias mais

sutis, como o atraso intra-uterino, os distúrbios bioquímicos e os psicomotores (MCELHATTON, 1999).

A teratologia é o estudo das causas, mecanismos, manifestações e prevenção de defeitos congênitos; é um termo da ciência médica preocupada com o estudo da contribuição ambiental ao desenvolvimento pré-natal alterado. (SMITHELLS, 1980). O principal objetivo da teratologia é a procura pelas causas de malformações congênitas em organismos vivos (WILSON, 1977; SCHARDEIN, 2000).

Um agente teratogênico ou teratógeno é definido como toda e qualquer substância, organismo, agentes físicos ou químicos que, quando presente durante a vida embrionária ou fetal, possam produzir uma alteração na estrutura ou na função da descendência (DICKE, 1989); assim como déficits neuro-comportamentais, retardo de crescimento e até mesmo a morte intra-uterina (JUCHAU, 1989; ADAMS, 1993; BRIGGS; FREEMAN; YAFFE, 1998). Estes fatos foram reconhecidos a partir do século 20, após danos observados em recém nascidos, em que as mães fizeram uso de alguns medicamentos durante a gestação, tais como a talidomida, o ácido-retinóico, a vitamina A; ou foram expostas durante o período gestacional ao álcool, à radiação e às infecções (SHEPARD, 1995, SCHULER-FACCINI et al., 2002).

Os teratógenos possuem mecanismos de ação específicos para cada fase de desenvolvimento das células, podendo agir de forma direta ou indireta, ou seja, interferindo no funcionamento intra ou extracelular, podendo alterar diversas atividades celulares, como: modulação da expressão gênica, biossíntese de enzimas, crescimento tecidual, pH celular e processo mitótico (ROGERS et al., 2000) e estes efeitos alteram, conseqüentemente, etapas básicas do desenvolvimento dos organismos, causando malformações estruturais, retardo no crescimento intra-uterino, alterações neurológicas, comportamentais e até mesmo, morte fetal (MCELHATTON, 1999).

Segundo Wilson, (1977) os princípios básicos, para se determinar a ação de um agente teratogênico sobre o embrião ou feto em desenvolvimento, destacam-se:

- (1) estágio de desenvolvimento do conceito: a susceptibilidade ao agente teratógeno varia de acordo com o período de desenvolvimento embriofetal, ou seja, dependendo de qual fase do desenvolvimento o teratógeno entrar em contato, as sequelas resultantes serão diferentes.

(2) relação entre dose e efeito: a teratogenicidade é diretamente proporcional à dose do agente, podendo variar desde a ausência de um efeito até a morte fetal.

(3) genótipo materno-fetal: a manifestação de uma reação ao teratógeno é influenciada pela sua absorção, seu metabolismo e sua distribuição na circulação materna, assim como sua transferência placentária e o próprio metabolismo fetal.

(4) mecanismo patogênico específico de cada agente: cada teratógeno tem uma forma diferente de agir na célula e desencadear uma resposta diferente a este estímulo, como malformações, déficits de crescimento e funcionais e até mesmo, morte celular.

O desenvolvimento embriofetal de mamíferos pode ser dividido em quatro períodos: implantação, organogênese ou organogênético, desenvolvimento fetal e período neonatal. A exposição a agentes tóxicos no período inicial do desenvolvimento, período de implantação, que compreende desde a fusão do óvulo e do espermatozóide até o implante do blastocisto no útero, pode variar conforme o número de células atingidas pelo agente tóxico, ou seja, quanto maior o número de células atingidas, maior será a chance de ocorrer uma embrioletalidade, sendo rara a ocorrência de teratogênese. O período de organogênese abrange desde a proliferação e migração celular até a formação de órgãos rudimentares; nesta fase ocorre maior suscetibilidade à ação do agente tóxico, podendo acarretar em malformações estruturais. Após a organogênese, segue-se o período fetal e neonatal; exposições que se iniciam durante estes períodos podem causar anormalidades celulares e teciduais, podendo interferir em funções normais de importantes sistemas, tais como: o sistema nervoso central, o sistema imune ou o sistema endócrino; além de causar retardo geral do desenvolvimento e, portanto, não havendo mais neste período, suscetibilidade do feto em desenvolver malformações induzidas por toxicantes (ROGERS; KAVLOCK, 2001; LEMONICA, 2008; BERNARDI, 2011).

Até o presente estudo, não houve relatos na literatura sobre os efeitos do extrato de *C. scolymus* no sistema imune e nem na toxicologia do desenvolvimento; e com o aumento cada vez maior do consumo de plantas como recurso terapêutico pela população e pela liberação de vários extratos vegetais, para o consumo e também para a produção de fitoterápicos, sem a necessidade de estudos científicos sobre sua eficiência e segurança, a

presente pesquisa tem por objetivo estudar os possíveis efeitos imunotóxicos e teratogênicos produzidos pelo extrato de *C. scolymus*, seguindo os protocolos estabelecidos pela OECD – *Organization for Economic Co-Operation Development*.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Verificar os possíveis efeitos produzidos pela administração sub-aguda em doses repetidas (28 dias) do extrato seco de *C.scolymus*, em diferentes doses, na toxicidade geral e no sistema imune, em ratos adultos, machos e fêmeas.
- Verificar os possíveis efeitos tóxicos produzidos pela administração do extrato seco da *C.scolymus*, em ratas durante o período gestacional.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e quantificar a presença da cinarina e da cinaropicrina, no extrato seco de *C.scolymus* (Santos Flora®), utilizado em neste trabalho de pesquisa.
- Verificar a possível ocorrência de toxicidade promovida pela administração do extrato seco de *C.scolymus*, em ratos adultos tratados durante 28 dias, empregando-se:
 - Mensuração do ganho de peso, do consumo de água e ração, bioquímica sérica, hemograma, peso relativo do timo, baço, fígado e rim; celularidade do baço e timo e da análise histopatológica de diferentes tecidos.
 - Testes para avaliação da imunidade inata: atividade de macrófagos peritoneais e neutrófilos circulantes por meio da fagocitose e *burst* oxidativo por citometria de fluxo.
 - Testes para avaliação da imunidade humoral: titulação de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro.
 - Testes para avaliação da imunidade celular: reação de hipersensibilidade tardia (DTH).

- Testes para avaliação da resposta imune adquirida: proliferação de linfócitos B e T *in vitro* e fenotipagem de linfócitos B e T por citometria de fluxo.
- Verificar a possível ocorrência de toxicidade materna e da prole promovida pela administração do extrato seco de *C.scolymus*, em diferentes doses, durante a gestação.
- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos da administração do extrato seco de *C.scolymus*, em diferentes doses, sobre o desempenho reprodutivo de ratas tratadas durante a gestação.
- Verificar os possíveis efeitos teratogênicos promovidos pela administração, do extrato seco de *C.scolymus*, em diferentes doses, na prole de ratas tratadas durante a gestação, através das análises ósseas e viscerais dos fetos

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, com idade a partir de 60 dias, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram alojados em gaiolas de plástico fosco com tampas metálicas, um animal por caixa, medindo 40x50x20cm. Todas as gaiolas foram mantidas em salas com aeração, exaustão, temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (45% - 65%) controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central em um ciclo claro/escuro de 12 h. Água e ração foram fornecidos *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da FMVZ-USP e estão protocolados sob o nº 2160/2011.

4.2 EXTRATO SECO DE *Cynara scolymus*

O extrato seco da *C.scolymus* foi adquirido de uma empresa que comercializa extratos para a indústria farmacêutica, Santos Flora®. Esta empresa fornece o laudo técnico e identificativo de Controle de Qualidade (Anexo 1).

4.3 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Acetona (Merck®), adjuvante completo de Freund (FCA) (Sigma®), alizarina vermelha, analisador bioquímico CELM-SB 200, analisador sanguíneo ABC VET® (Horiba), anasedan (xilazina) (Vetbrands®), anatoxina tetânica (AT) (lote nº: IB – AnT/PAG 04/09 - Butantan), anticorpos para ratos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45, anti-IgM e CD16/CD32 (BD Biosciences®), azul de tripan 4% (Gibco®, Invitrogen cell culture), centrífuga refrigerada (Eppendorf), Citômetro de fluxo (Becton Dickinson Immunocytometry System), Diclorometano (Merck®), Dopalen (cetamina) (Vetbrands®), EDTA (Merck®), Formol (Quimex), Hepamax S (heparina) (Blausiegel), iodeto de propídeo (PI) (Sigma), LPS (Sigma), Metanol (Merck®), PMA (Sigma), RPMI-1640

(Gibco), Rotaevaporador (Fisaton), Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco®, Invitrogen cell culture).

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 Análise química¹ do extrato seco de *Cynara scolymus*

Análises qualitativas e quantitativas do extrato foram realizadas de acordo com Noldin et al. (2003), com modificações. O extrato seco de *C.scolymus* foi solubilizado com diclorometano, agitado manualmente e filtrado. Em seguida, o material sólido resultante foi extraído com metanol por duas vezes. Foram obtidas, desta forma, as frações diclorometano e metanólica, as quais foram submetidas posteriormente às análises cromatográficas (CCD - cromatografia em camada delgada) para identificação da cinarina e cinaropicrina e em seguida, foi realizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a confirmação e quantificação das mesmas.

O pico da cinarina, no extrato seco de *Cynara scolymus*, foi identificado por comparação de seu tempo de retenção e seu espectro ultravioleta com os dados equivalentes obtidos para o pico de cinarina (padrão). As análises foram feitas em duplicata e a quantificação foi realizada através da correlação entre o valor das áreas dos picos respectivos às concentrações correspondentes, na curva analítica.

Figura 2: Cromatograma da amostra do padrão de cinarina a 270 nm.

Fonte: (MATTOS, 2014)

¹ O estudo químico foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, do Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas, da Universidade do Vale do Itajaí, SC.

4.4.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi utilizado cromatógrafo (CLAE) marca Shimadzu com detector tipo diode array (SPD M 10A), software (versão 5.032, Class VP), sistema de bomba (LC10AD VP), sistema controlador (SCL 10A VP), sistema de válvulas (SCV 10AC-VP) e sistema de injeção manual (looping de 20 µL). As amostras foram filtradas por membrana de celulose regenerada (0,45 µM). Todas as análises foram realizadas em triplicata analisadas quanto ao perfil cromatográfico apresentando comparando-se os diferentes cromatogramas com o perfil da *C. scolymus*. Foi utilizado sistema de gradiente, em coluna C 18 Novapak (3,5 mm x 10 cm), termostatizada (30 °C), com uma fase móvel e comprimento de onda de 340nm.

4.4.2 Administração do extrato seco de *Cynara scolymus*

O extrato seco de *C. scolymus* é apresentado em forma de pó fino e para sua utilização, foi adicionado à água para administração aos animais por via oral, através de gavagem.

Os animais foram divididos em quatro grupos: Controle (água), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg. As doses do extrato de alcachofra foram empregadas de acordo com a indicação de uso destes fitoterápicos pelos fabricantes; assim, a dose diária total recomendada é de até 2g; portanto, esta e outras duas doses, uma menor e outra maior, foram determinadas. Cada grupo foi composto por 5 machos e 5 fêmeas, que receberam o extrato nas doses descritas, via oral, por gavagem, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, durante 28 dias. Durante todo o tratamento os ratos foram pesados a cada três dias para o ajuste da dose.

4.4.3 Avaliação do consumo de água, ração, mensuração do peso corpóreo e avaliação clínica

Os animais foram avaliados quanto à variação do peso corpóreo a cada três dias e os consumos de água e ração foram mensurados semanalmente.

Os animais foram observados diariamente quanto aos sinais de toxicidade, tais como: alteração da locomoção, alteração em pele, pêlos e mucosas, piloereção, sialorréia,

hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade, contorções abdominais, tremores, diarreia, letargia e coma.

4.4.4 Avaliação do hemograma e bioquímica sérica

Para a coleta de sangue, os ratos permaneceram em jejum de quatro horas; estes foram anestesiados com xilazina e cetamina (5,0 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente) por via intra peritoneal e, em seguida, foram submetidos a realização da punção cardíaca. Uma alíquota de sangue foi coletada em tubos com EDTA para realização do hemograma em aparelho automatizado (Vet ABCTM *Animal Blood Counter*, Horiba, ABX *Diagnostics*) e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através da coloração com Rosenfeld.

Outra alíquota foi coletada em tubos secos para análises das enzimas hepáticas (alanina-aminotransferase, aspartatoaminotransferase e fosfatase alcalina), uréia, creatinina, proteínas totais, albumina, glicose, colesterol, triglicérides, bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta. Essas amostras foram coletadas em tubos ao abrigo da luz até o momento de leitura para não comprometer os resultados, principalmente das bilirrubinas, que podem sofrer degradação. As amostras de sangue coletadas em tubo seco foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos para separação do soro e conservado à - 20 °C até sua posterior análise, por meio da utilização de Kit comercial da Laborlab em equipamento da CELM – SBA 200.

4.4.5 Avaliação do peso relativo do baço, timo, fígado, rim e celularidade do baço e timo

Após a coleta do sangue, os animais foram submetidos à eutanásia por anestesia profunda (xilazina e cetamina, 5,0 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente) e em seguida foram coletados o timo, baço, fígado e rim. A seguir, procedeu-se a pesagem dos órgãos para cálculo do peso relativo (g/100g de peso vivo). Posteriormente, o baço foi macerado e após a lise das hemácias os esplenócitos foram mantidos em gelo até contagem. A viabilidade e

contagem global das células nucleadas foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando o corante tripan-blue.

4.4.6 Necropsia e avaliação histopatológica de órgãos linfóides, adrenais, fígado, timo e rim

Decorridos os 28 dias do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia para avaliação macroscópica de possíveis lesões e para coleta dos seguintes órgãos: fígado, rins, baço, timo, adrenais e cadeia de linfonodos mesentéricos.

Todos os tecidos foram fixados em formol (10%), emblocados em parafina e, posteriormente, as lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica.

4.4.7 Fenotipagem dos linfócitos esplênicos, tímicos e do sangue periférico por citometria de fluxo

A fenotipagem foi realizada através da avaliação de moléculas de superfície celular específicas a cada tipo de linfócito.

Desta maneira, o baço e o timo foram coletados e macerados em meio RPMI sendo a suspensão de células esplênicas submetida à hemólise. Todas as suspensões foram ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/tubo em um volume de 50 μ L.

Para análise fenotípica do sangue, procedeu-se a lise de 200 μ L de sangue com solução salina hipotônica para então se iniciar a marcação com os anticorpos.

Para marcação das moléculas de superfície foram empregados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 e anti-CD4 para linfócitos T *helper*; anti-CD3 e anti-CD8 para detectar linfócitos T citotóxicos; anti-CD45 e anti-IgM para detectar os linfócitos B. Antes das marcações descritas acima foi adicionado o anticorpo CD16/CD32 em cada tubo para evitar marcação inespecífica por 5 minutos a 4°C. Em seguida, as amostras foram incubadas a 4°C durante 30 minutos, no escuro, com os diferentes anticorpos,

centrifugadas e ressuspensas em 200 μ L de PBS 1X para avaliação através de citometria de fluxo (FACScan Becton Dycson®).

4.4.7.1 Citometria de fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (*Becton Dickison Immunocytometry System*, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Machintosh Apple, CA, USA). Foram adquiridos 10.000 eventos por meio de um programa denominado *Cell Quest Pro*® (*Becton Dickison Immunocytometry System*, San Jose, CA, USA).

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – *Foward Scatter* e SSC – *Side Scatter* que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. As fluorescências foram adquiridas em escala logarítmica. A fluorescência do *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) foi detectada pelo filtro FL-1 (530 nm) e a do iodeto de propídeo (PI) foi detectada pelo filtro FL-2 (585 nm).

Foram analisadas através do FlowJo 7.2.2® (Tree Star Inc, Ashland, USA) as populações de interesse em cada experimento por meio de *gates*, excluindo assim outros tipos celulares das amostras. Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo branco como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

4.4.8 Avaliação da proliferação de linfócitos T antígeno-específica por citometria de fluxo

4.4.8.1 Indução da resposta imune celular

Para indução da resposta imune celular foi utilizada anatoxina tetânica (AT) como antígeno. Resumidamente, os ratos foram imunizados com 100 μ L de AT [50 LF/mL] diluída 1:1 em PBS 1X e FCA, por via subcutânea. Sete dias após esta imunização, os ratos foram sacrificados para coleta do baço.

4.4.8.2 A técnica

Para avaliação da proliferação de linfócitos T antígeno-específica foi utilizado o protocolo proposto por Latorre et al. (2009) com modificações. Após coleta, o baço foi masserado para a preparação de uma suspensão celular. As hemácias presentes nesta suspensão foram lisadas com solução de lise e os esplenócitos foram mantidos por duas horas em estufa (37°C, 5% CO₂ e atmosfera umidificada) para separação das células não-aderentes (NA) e aderentes (AD). Em seguida, as células foram coletadas, contadas e co-cultivadas na proporção de 30:1 (NA:AD), ou seja, $1,93 \times 10^5$ NA ($4,29 \times 10^6$ células/mL, plaqueia 45 µL) e $6,5 \times 10^3$ AD ($1,44 \times 10^4$ células/mL, plaqueia 45 µL). Por fim, as placas foram mantidas em estufa por 72 horas, sendo realizada a aquisição de 20000 células por citometria de fluxo (FACS Calibur). O resultado foi expresso através do índice de proliferação que é determinado pela divisão da % de linfócitos estimulados pela % de linfócitos basais.

4.4.9 Avaliação da atividade dos neutrófilos presentes no sangue periférico e de macrófagos peritoneais através da medida de “burst” oxidativo e fagocitose por meio de citometria de fluxo

Para a avaliação da atividade de neutrófilos circulantes, foi utilizado o método proposto por Hasui et al. (2004) com modificações. Assim, após o término do tratamento, os ratos foram submetidos à eutanásia, por anestesia profunda, sendo imediatamente coletado sangue com o anticoagulante heparina. Os tubos (cinco por amostra) para citometria de fluxo foram preparados da seguinte maneira:

Tubo 1: 100 µL de sangue em 1 mL de PBS

Tubo 2: 100 µL de sangue, 200 µL de DCFH-DA (0,3 µM) em 800 µL de PBS. O DCFH-DA reage com os radicais livres produzidos pelas células e emite fluorescência verde.

Tubo 3: 100 µL de sangue, 100 µL de *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo (SAPI) em 900µL de PBS. O iodeto de propídeo se intercala no DNA da célula e emite uma fluorescência vermelha.

Tubo 4: 100 μ L de sangue, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de SAPI em 700 μ L de PBS.

Tubo 5: 100 μ L de sangue, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de PMA (1 ng/ μ L) em 700 μ L de PBS.

Para a avaliação da atividade de macrófagos peritoneais, após os animais serem submetidos à eutanásia, foram injetados 10 mL de PBS 1x a 4°C na cavidade abdominal e depois de repetidas massagens locais, foi colhida uma suspensão de células, através de uma punção da cavidade peritoneal. Estas células foram mantidas em banho de gelo até serem quantificadas em câmara de Neubauer. Esta suspensão de células foi ajustada a uma concentração de 2×10^6 células/mL e os tubos (cinco por amostra) para a citometria de fluxo foram preparados da seguinte forma:

Tubo 1: $2,0 \times 10^5$ células em 1 mL de PBS

Tubo 2: 100 μ L da amostra, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M) em 800 μ L de PBS. O DCFH-DA reage com os radicais livres produzidos pelas células e emite fluorescência verde.

Tubo 3: 100 μ L da amostra, 100 μ L de *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo (SAPI) em 900 μ L de PBS. O iodeto de propídeo se intercala no DNA da célula e emite uma fluorescência vermelha.

Tubo 4: 100 μ L da amostra, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de SAPI em 700 μ L de PBS.

Tubo 5: 100 μ L da amostra, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de PMA (1 ng/ μ L) em 700 μ L de PBS.

O PMA e o SAPI foram utilizados como estímulos *in vitro* para produção de radicais livres de oxigênio. O tubo contendo apenas SAPI foi utilizado para avaliação da fagocitose. Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 30min, logo após adicionou-se 2mL de EDTA (3 mM) para parar a reação. As amostras foram então centrifugadas 1500 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 300 μ L de PBS, para a avaliação de macrófagos peritoneais e analisadas no citômetro de fluxo. Já para a avaliação dos neutrófilos circulantes, após a centrifugação, as amostras foram ressuspensas em 2 mL de cloreto de

sódio 0,2%. Após 20 segundos, foram adicionados 2 mL de cloreto de sódio 1,6% e as amostras foram centrifugadas novamente. Este processo foi repetido mais uma vez para lise completa dos eritrócitos. Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS. Em seguida fez-se a análise por citometria de fluxo.

Cada amostra foi passada no citômetro de fluxo sendo adquiridos 10.000 eventos. Os valores referentes ao *busrt* oxidativo e a fagocitose foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos neutrófilos peritoneais. Este valor é dado pelo aparelho a partir do *gate* selecionado para a população celular de interesse e pela análise do histograma de fluorescência da população. Os dados foram analisados através do programa FlowJo 7.2.2® (Tree Star Inc, Ashland, USA).

4.4.10 Titulação de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (anti-SRBC)

4.4.10.1 Preparação dos eritrócitos de carneiro (SRBC)

Os eritrócitos de carneiro foram coletados de um animal adulto e sadio proveniente do CEPTOX /USP. As coletas foram realizadas de forma asséptica em tubos Vacutainer® e mantidas em geladeira por pelo menos 24 horas antes do uso. Após este período, estas células foram centrifugadas a 2000 rpm por 8 minutos para retirada do plasma e lavadas três vezes com PBS 1X, centrifugadas, contadas e ajustadas para a concentração de interesse em PBS 1X.

4.4.10.2 A técnica

A técnica de titulação de anticorpos anti-SRBC foi realizada de acordo com SHARMA et al. (1984) com modificações. Os animais foram imunizados com eritrócitos de carneiro (SRBC), que foram previamente lavados em salina (3000 rpm, 15 min, a 10° C) e uma suspensão de células a $2,0 \times 10^9$ SRBC/mL foi preparada. Cada rato adulto recebeu 1,0 mL desta suspensão por via intra-peritoneal.

Sete dias após a sensibilização, os animais foram submetidos à coleta de sangue, para obtenção do soro e realização da titulação de anticorpos. Para a titulação, foi colocado no primeiro poço de uma placa de 96 poços de fundo em U, 30 µl de soro de rato não sensibilizado com o SRBC e em cada poço subsequente foram colocados 30 µl de salina. A seguir, foram então plaqueadas as amostras de soro coletadas dos ratos da seguinte forma: na primeira linha de poços, plaqueou-se 30 µl de soro de animal não sensibilizado no primeiro poço (controle negativo) e deste, retirou-se 30 µl e adicionou-se no segundo poço e assim por diante, até o 12º poço (diluição seriada). Na sequência de linhas, plaqueou-se o soro dos animais sensibilizados. Após a diluição seriada do soro, foram adicionados a cada poço, 30 µl da suspensão de SRBC a 10%.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora, e após este período fez-se a leitura. Estabeleceu-se o título de anticorpos como sendo aquele em que o botão de eritrócitos formado foi semelhante àquele do controle negativo, bem como semelhante às diluições subsequentes, ou seja, a partir do momento em que não mais foi observada a hemaglutinação ocasionada pelos anticorpos anti-SRBC. O título de anticorpos foi expresso de acordo com a graduação da diluição realizada nos poços da placa, sendo a primeira diluição (1/2) tida como título 1 e assim por diante.

4.4.11 Avaliação da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

Para a sensibilização imunológica dos ratos, foi injetado por via subcutânea, na base da cauda de cada animal, 0,1 mL de KLH em (1,0 mg/mL PBS) emulsificado em Adjuvante completo de Freund na razão de 1:1.

Sete dias após a sensibilização, preparou-se o *heat-aggregated* KLH, aquecendo-se o mesmo (10 mg/mL em salina) por 1 hora em banho-maria a 75°C. Esta solução foi centrifugada a 2000 rpm, por 10 minutos, para remover o excesso de salina; a seguir foi injetada (0,1 mL/por animal) no coxim plantar direito dos animais.

Após 24 horas de desafio, o aumento de volume resultante foi mensurado. A avaliação da resposta imune celular (DTH) foi verificada após mensuração, por paquímetro, do

edema formado na pata dos animais sensibilizados com KLH e foi expresso em milímetros (mm).

4.4.12 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

As ratas foram colocadas com os machos para o acasalamento, no período noturno (das 18:00 as 8:00 h). A confirmação de prenhez foi realizada pela presença de espermatozóide no lavado vaginal, sendo esta verificada por meio de observação microscópica do esfregaço vaginal (VICKERY; BENNETT, 1970). A presença de espermatozóides no esfregaço vaginal foi considerada como indicador do dia 0 da prenhez.

4.4.13 Administração do extrato seco de *Cynara scolymus* durante a gestação

As fêmeas foram separadas em quatro grupos, com 12 ratas em cada grupo, sendo o extrato seco de *Cynara scolymus* preparado conforme descrição no item 4.2. A administração do extrato às ratas gestantes iniciou-se no 6º dia ao 19º dia de gestação, conforme descrição no item 4.4.2.

4.4.14 Avaliação do peso corpóreo, consumos de água e ração e avaliação clínica das ratas gestantes

O peso corpóreo das ratas foram mensurados a cada três dias, sendo o ganho de peso gestacional avaliado nos dias de gestação 0, 7, 14 e 20. Durante o período gestacional o consumo de água e ração foram mensurados semanalmente.

As ratas foram observadas diariamente quanto aos sinais de toxicidade, tais como: alteração da locomoção, alteração em pele, pêlos e mucosas, piloereção, sialorréia, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade, contorções abdominais, tremores, diarreia, letargia e coma.

4.4.15 Cesariana

No 20º DG, as fêmeas foram anestesiadas com xilazina e cetamina e submetidas à secção cesariana; foi realizada a laparotomia exploratória com exposição dos cornos uterinos, para a contagem de pontos de implantações, de reabsorções, número de fetos vivos e mortos e em seguida a retirada das placentas e dos fetos para posterior análise morfológica dos mesmos. Os ovários também foram retirados para contagem de corpos lúteos.

As perdas embrionárias, no período de pré-implantação e no período de pós-implantação foram calculadas por meio da seguinte proporção:

$$\% \text{ perda pré-implantação} = (CL - IM) \times 100/CL$$

$$\% \text{ perda pós-implantação} = (IM - FV) \times 100/IM$$

Onde: CL = número de corpos lúteos; IM = número de implantações e FV = número de fetos vivos.

4.4.16 Análise dos fetos no 20º dia de gestação

Após a cesariana, os fetos foram contados no útero; em seguida, o útero foi extraído inteiro e pesado. Posteriormente, os filhotes foram retirados do útero e examinados quanto a possíveis malformações; em seguida, os fetos e suas respectivas placentas foram secos e submetidos à pesagem individual. As medidas: comprimento do corpo, diâmetro cranial e torácico também foram avaliadas.

4.4.17 Análise visceral e óssea dos fetos

4.4.17.1 Análise visceral

Foram coletados 4 fetos de cada ninhada e após eutanásia, estes foram colocados em 220 mL da solução de Harrison para fixação das estruturas viscerais e descalcificação dos ossos por um período de 4 dias. Os frascos foram tampados e identificados. Em seguida, os fetos foram colocados em álcool 80º por 2 dias e, posteriormente, em álcool 90º por no

mínimo 4 dias até leitura. Foi empregado o método de secções seriadas de Wilson (1965) para a análise de malformações e anomalias internas.

4.4.17.2 Análise óssea

Foram coletados 4 filhotes de cada ninhada e após eutanásia, estes foram colocados em acetona, permanecendo nesta solução por uma noite. No dia seguinte, o palato de cada animal foi examinado e procedeu-se a evisceração. Em seguida, foi realizado o procedimento de diafanização que consiste em colocar os fetos em uma solução de KOH 0,8%, preparada diariamente com água destilada e alizarina, conforme o método proposto por Staples e Schenell (1964), e esta solução foi trocada diariamente por 4 dias. Esses fetos foram conservados em solução clareadora até a análise esquelética, segundo Taylor (1986); os fetos foram observados em um estereoscópio com aumento de 10x e foi analisado o grau de ossificação através dos principais centros de ossificação (falanges, metacarpos, metatarsos, costelas, vértebras caudais e esternébras) e também, a ocorrência de variações e malformações ósseas.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Para dados paramétricos, utilizou-se as análises de variância ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett ou ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. Para dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Foram consideradas significantes as análises que apresentaram nível de significância $p < 0,05$. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão e os dados de porcentagem estão expressos como mediana (mínimo – máximo).

*DELINEAMENTO
EXPERIMENTAL E
RESULTADOS*

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: ANÁLISE QUÍMICA DO EXTRATO SECO DE *C. scolymus*

5.1.1 Delineamento experimental

A metodologia empregada na análise química do extrato seco de *C. scolymus* foi realizada conforme descrito no item 4.4.1.

5.1.2 Resultados

A análise de regressão linear da curva analítica obtida pela correlação dos valores das áreas de cada pico com as suas respectivas concentrações comprovou a linearidade do método; a figura 3 ilustra o gráfico, que mostra a curva analítica, a equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2).

Através das análises quantitativas realizadas, confirmou-se a presença de cinarina, quantificada em 3,7%, no extrato seco de *C. scolymus*; a sobreposição dos cromatogramas do extrato seco de *C. scolymus* e o padrão de cinarina (figura 4) e a figura 5 mostra o cromatograma do extrato seco de *C. scolymus*. Quanto à cinaropictina, foi encontrado em muito pouca quantidade, insuficiente para quantificação.

Figura 3 - Curva analítica, equação da reta e coeficiente linear do extrato seco de *C.scolymus*, obtido por CLAE

Fonte: (MATTOS, 2014).

Figura 4 - Sobreposição dos cromatogramas, a $\lambda = 315$ nm, onde (a) Extrato de *C. scolymus* e (b) padrão de cinarina

Fonte: (MATTOS, 2014).

Figura 5 – Cromatograma do extrato seco de *C.scolymus*

Fonte: (MATTOS, 2014).

5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO, CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO, PESO RELATIVO DO BAÇO, TIMO, FÍGADO, RIM, CELULARIDADE DO BAÇO E DO TIMO E ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES, FÍGADO, RIM E ADRENAIS EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO SECO DE *C. scolymus*, EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS

5.2.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos e fêmeas, separados em quatro grupos iguais, um controle e três experimentais (n=10; 5 machos e 5 fêmeas), os quais receberam, respectivamente, as doses de 0g/kg (controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do extrato seco de *C.scolymus*, via oral, através de gavagem, durante 28 dias, conforme descrito no item 4.4.2. Os animais do grupo controle (CO) receberam água pelo mesmo período e via de administração. O peso e os consumos de água e ração foram mensurados conforme descrito no item 4.4.3.

Após esse período, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de órgãos linfóides, fígado, rins e adrenais, os quais foram utilizados para os procedimentos de análise de celularidade e peso relativo (item 4.4.5) e coleta de soro e sangue que foram utilizados, respectivamente, para realização da bioquímica sérica e hemograma completo, conforme descrito no item 4.4.4; por fim, a coleta de fragmentos dos órgãos linfóides, fígado e rins para análise histopatológica (item 4.4.6).

5.2.2 Resultados

Em relação à avaliação clínica, os animais tratados com o extrato seco de *C.scolymus*, não apresentaram nenhum sinal de toxicidade, nas doses empregadas.

A tabela 1 mostra o peso total (em gramas - g) e a tabela 2, o consumo total de ração (g) e água (em mililitros – mL) de ratos, machos e fêmeas, tratados com extrato seco de

C.scolymus, nas doses 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg. A análise estatística empregada revelou não haver diferença significativa entre os grupos.

Na avaliação do peso relativo do baço, a análise estatística empregada revelou haver diferenças entre os grupos ($p=0,0076$, ANOVA), mostrado na tabela 3. O pós teste de Dunnett apontou aumento significativo no peso relativo do baço, nos machos tratados com a maior dose do extrato, quando comparado com os animais do grupo controle; na avaliação do peso relativo dos rins, a análise estatística empregada indicou haver diferenças significantes entre os grupos ($p=0,0033$, ANOVA). O pós teste de Dunnett apontou aumento significativo no peso relativo do rim, nas fêmeas tratadas tanto com a menor na maior dose do extrato, quando comparadas aos animais do grupo controle. Com relação ao peso relativo do fígado e do timo, a análise estatística empregada revelou não haver diferença significativa entre os grupos, quando comparados ao grupo controle.

Em relação a análise da celularidade do baço, o teste estatístico empregado revelou haver diferenças significantes entre os grupos ($p=0,0050$, ANOVA); o pós teste de Dunnett apontou aumento significativo na celularidade do baço nos machos tratados com a dose intermediária e com a maior dose do extrato, quando comparados aos animais do grupo controle (tabela 4).

Na avaliação da celularidade do timo, a análise estatística empregada revelou haver diferenças significantes entre os grupos ($p=0,0001$, ANOVA). O pós teste de Dunnett apontou diminuição significativa deste parâmetro nos machos e nas fêmeas tratados com a menor dose, bem como, nas fêmeas da dose intermediária, quando comparadas aos animais do grupo controle (tabela 4).

As tabela 5, 6 e 7 apresentam, respectivamente, os dados do hemograma, da contagem diferencial de células e os parâmetros bioquímicos de ratos, machos e fêmeas, tratados com extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de: 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. A análise estatística empregada revelou não haver diferenças significantes entre os grupos, quando comparados ao grupo controle.

Na análise histopatológica dos órgãos linfóides, adrenais, do fígado e dos rins não foram observadas alterações morfológicas ou estruturais, macro ou microscópicas significantes.

Tabela 1 – Ganho de peso total de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de: 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão

		Controle	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
		(n=10)	1 (n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
Peso total (g)	♂	85,2 $\pm$ 12,2	73,6 $\pm$ 6,2	73,1 $\pm$ 5,4	74,9 $\pm$ 5,0
	♀	62,6 $\pm$ 1,2	58,3 $\pm$ 2,8	59,6 $\pm$ 2,6	58,1 $\pm$ 2,6

Fonte: (MATTOS, 2014).

Tabela 2 – Consumo total de ração e água de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de: 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Consumo		Controle	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
		(n=10)	1 (n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
Ração total (gramas)	♂	905,0 $\pm$ 21,2	900,1 $\pm$ 10	901,2 $\pm$ 12,5	901,8 $\pm$ 13,3
	♀	305,0 $\pm$ 21,2	312,0 $\pm$ 8,3	312,4 $\pm$ 9,3	310,1 $\pm$ 7,7
Água total (ml)	♂	892,0 $\pm$ 35,6	920,0 $\pm$ 42,4	921,0 $\pm$ 43,2	925,3 $\pm$ 45,1
	♀	619,4 $\pm$ 6,8	740,0 $\pm$ 34,1	742,2 $\pm$ 36,6	743,5 $\pm$ 37,8

Fonte: (MATTOS, 2014).

Tabela 3 – Avaliação do peso relativo do baço, timo, rim e fígado (gramas/100g de peso vivo) de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de: 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Peso relativo		Controle (n=10)	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
			1 (n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
Baço	♂	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0*
	♀	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
Timo	♂	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
	♀	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
Rim	♂	0,8 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0
	♀	0,7 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0**	0,8 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0**
Fígado	♂	3,8 $\pm$ 24,9	4,0 $\pm$ 11,8	4,0 $\pm$ 24,6	4,9 $\pm$ 39,3
	♀	3,8 $\pm$ 35,6	3,9 $\pm$ 21,9	4,0 $\pm$ 40,8	4,0 $\pm$ 23,0

Fonte: (MATTOS, 2014).

*p<0,05; **p<0,01 versus grupo controle, ANOVA seguida do pós teste de Dunnett.

Gráfico 1 – Peso relativo do baço (g/100g de peso vivo) de ratos, machos, tratados por gavagem, com extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de: 0g/kg (CO), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo

Fonte: (MATTOS, 2014).

*p<0,05 versus grupo controle, ANOVA seguida do pós teste de Dunnett.

Gráfico 2 – Peso relativo dos rins (gramas/100g de peso vivo) de ratos, fêmeas, tratadas por gavagem, com extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de: 0g/kg (CO), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo

Fonte: (MATTOS, 2014).

**p<0,01 versus grupo controle, ANOVA seguida do pós teste de Dunnett.

Tabela 4 – Avaliação da celularidade ($\times 10^6$ células) do baço e timo de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de: 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Celularidade		Controle (n=10)	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
			1 (n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
Baço	♂	59,7 $\pm$ 7,2	75,8 $\pm$ 19,6	82,9 $\pm$ 7,9*	90,4 $\pm$ 6,4**
	♀	44,3 $\pm$ 4,8	47,1 $\pm$ 11,0	45,1 $\pm$ 5,7	56,9 $\pm$ 9,7
Timo	♂	226,6 $\pm$ 16,8	155,1 $\pm$ 22,2***	249,9 $\pm$ 9,1	229,7 $\pm$ 13,5
	♀	184,1 $\pm$ 8,2	89,8 $\pm$ 3,4***	159,3 $\pm$ 12,0**	198,4 $\pm$ 13,7

Fonte: (MATTOS, 2014).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 versus grupo controle, ANOVA seguida do pós teste de Dunnett.

Gráfico 3 – Celularidade ($\times 10^6$ células) do baço de ratos, machos, tratados por gavagem, com extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de: 0g/kg (CO), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo

Fonte: (MATTOS, 2014).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus grupo controle, ANOVA seguida do pós teste de Dunnett.

Figura 6 – Celularidade ($\times 10^6$ células) do timo de ratos, machos e fêmeas, tratados com extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de: 0g/kg (CO), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo

Fonte: (MATTOS, 2014).

p<0,01, *p<0,001 versus grupo controle, ANOVA seguida do pós teste de Dunnett.

Tabela 5 - Parâmetros hematológicos de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de: 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Parâmetros Hematológicos		Controle (n= 10)	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
			1 (n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	♂	7,9 $\pm$ 1,4	7,8 $\pm$ 1,2	7,9 $\pm$ 1,4	7,8 $\pm$ 1,4
	♀	7,1 $\pm$ 1,7	6,8 $\pm$ 0,7	6,9 $\pm$ 0,6	6,9 $\pm$ 0,5
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	♂	7,4 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,5	7,3 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,4
	♀	7,4 $\pm$ 0,4	7,2 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,4	7,3 $\pm$ 0,3
Hemoglobina (g/dl)	♂	16,6 $\pm$ 0,6	16,7 $\pm$ 0,6	17,1 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,7
	♀	16,8 $\pm$ 0,5	16,9 $\pm$ 0,7	16,7 $\pm$ 0,6	16,8 $\pm$ 0,7
Hematócrito (%)	♂	42,8 $\pm$ 1,4	42,2 $\pm$ 1,4	43,1 $\pm$ 2,2	43,4 $\pm$ 2,6
	♀	42,6 $\pm$ 1,6	41,5 $\pm$ 1,5	41,1 $\pm$ 2,1	42,7 $\pm$ 1,5
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	♂	848,0 $\pm$ 43,1	849,9 $\pm$ 38,1	849,1 $\pm$ 40,1	847,7 $\pm$ 45,4
	♀	849,5 $\pm$ 44,2	850,0 $\pm$ 34,3	851,4 $\pm$ 33,5	848,1 $\pm$ 35,7
VCM (fm^3)	♂	59,1 $\pm$ 1,2	58,6 $\pm$ 0,7	58,5 $\pm$ 0,52	58,9 $\pm$ 1,1
	♀	59,4 $\pm$ 1,2	58,4 $\pm$ 1,1	58,4 $\pm$ 0,65	59,0 $\pm$ 1,3
HCM (pg)	♂	22,2 $\pm$ 0,4	22,1 $\pm$ 0,4	21,4 $\pm$ 0,5	21,1 $\pm$ 0,8
	♀	21,4 $\pm$ 0,4	21,3 $\pm$ 0,3	21,1 $\pm$ 0,4	20,7 $\pm$ 0,7
CHCM (g/dl)	♂	37,7 $\pm$ 0,3	36,7 $\pm$ 0,7	36,5 $\pm$ 0,6	36,2 $\pm$ 0,6
	♀	37,4 $\pm$ 0,3	36,5 $\pm$ 0,7	36,6 $\pm$ 0,5	36,8 $\pm$ 0,6

Fonte: (MATTOS, 2014).

VCM = Volume corpuscular médio; HCM = Hemoglobina corpuscular média; CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 6 - Contagem diferencial de células sanguíneas de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de: 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Células		<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)			
		Controle (n=10)	1 (n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
Neutrófilos (%)	♂	14,3 $\pm$ 2,4	12,6 $\pm$ 2,1	12,8 $\pm$ 4,6	13,4 $\pm$ 7,3
	♀	14,8 $\pm$ 1,7	12,8 $\pm$ 3,3	15,8 $\pm$ 4,3	13,6 $\pm$ 2,9
Eosinófilos (%)	♂	0,3 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,9	0,3 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,5
	♀	0,3 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,4
Basófilos (%)	♂	0,9 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 1,3	1,3 $\pm$ 1,5	1,2 $\pm$ 1,5
	♀	0,7 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 1,2	0,9 $\pm$ 0,5
Linfócitos (%)	♂	79,1 $\pm$ 5,4	81,2 $\pm$ 3,7	79,2 $\pm$ 6,9	79,7 $\pm$ 6,1
	♀	80,0 $\pm$ 3,0	81,8 $\pm$ 4,3	79,6 $\pm$ 3,8	80,8 $\pm$ 2,8
Monócitos (%)	♂	5,7 $\pm$ 3,4	6,6 $\pm$ 2,9	5,5 $\pm$ 1,7	6,2 $\pm$ 2,2
	♀	5,2 $\pm$ 1,8	4,8 $\pm$ 2,2	4,9 $\pm$ 0,8	4,9 $\pm$ 1,5

Fonte: (MATTOS, 2014).

Tabela 7 - Parâmetros bioquímicos de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de: 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados 5 animais por grupo e por sexo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Parâmetros bioquímicos		Controle (n=10)	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
			1 (n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
AST ^a (U/L)	♂	199,8 $\pm$ 29,0	198,6 $\pm$ 37,8	181,6 $\pm$ 36,7	168,2 $\pm$ 17,6
	♀	201,4 $\pm$ 28,6	200,0 $\pm$ 35,3	182,2 $\pm$ 38,4	159,8 $\pm$ 7,3
ALT ^b (U/L)	♂	88,6 $\pm$ 14,0	82,8 $\pm$ 7,6	85,6 $\pm$ 15,7	82,4 $\pm$ 4,3
	♀	87,4 $\pm$ 6,6	89,8 $\pm$ 6,8	80,0 $\pm$ 5,6	81,8 $\pm$ 4,3
GGT ^c (U/L)	♂	1,0 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0
	♀	0,6 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0
FA ^d (U/L)	♂	166,6 $\pm$ 21,3	162,2 $\pm$ 17,1	164,2 $\pm$ 8,7	170,0 $\pm$ 21,3
	♀	98,8 $\pm$ 22,1	109,8 $\pm$ 21,8	85,0 $\pm$ 10,0	102,6 $\pm$ 26,3
Colesterol (mg/dl)	♂	67,0 $\pm$ 7,0	71,4 $\pm$ 9,7	60,4 $\pm$ 6,8	64,6 $\pm$ 5,3
	♀	84,0 $\pm$ 9,6	74,8 $\pm$ 17,8	83,6 $\pm$ 10,4	81,6 $\pm$ 16,2
Triglicerídeos (mg/dl)	♂	94,0 $\pm$ 35,1	104,8 $\pm$ 25,5	82,4 $\pm$ 9,7	109,6 $\pm$ 22,9
	♀	114,0 $\pm$ 12,2	112,2 $\pm$ 27,4	127,4 $\pm$ 19,6	127,8 $\pm$ 14,8
Albumina (g/dl)	♂	4,2 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,1
	♀	4,4 $\pm$ 0,0	4,5 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,0	4,4 $\pm$ 0,3
Proteína (g/dl)	♂	6,2 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,1
	♀	6,0 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,5	6,6 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,6
Glicose (mg/dl)	♂	289,2 $\pm$ 93,5	286,8 $\pm$ 84,9	269,4 $\pm$ 66,0	308,4 $\pm$ 115,3
	♀	279,0 $\pm$ 83,9	325,8 $\pm$ 22,3	296,4 $\pm$ 43,9	312,0 $\pm$ 23,3
Uréia (mg/dl)	♂	61,0 $\pm$ 4,2	56,6 $\pm$ 5,4	57,4 $\pm$ 5,6	61,6 $\pm$ 3,5
	♀	64,6 $\pm$ 2,1	59,2 $\pm$ 3,8	60,0 $\pm$ 3,3	62,2 $\pm$ 2,2
Creatinina (mg/dl)	♂	0,6 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0
	♀	0,6 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0
Bilirrubina total (mg/dl)	♂	0,6 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,2
	♀	0,5 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,2
Bilirrubina direta (mg/dl)	♂	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1
	♀	0,2 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,1
Bilirrubina indireta (mg/dl)	♂	0,4 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2
	♀	0,2 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,3
Imunoglobulinas (g/dl)	♂	2,0 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1
	♀	1,6 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,3

Fonte: (MATTOS, 2014).

^a AST = asparatato aminotransferase; ^b ALT = alanina aminotransferase; ^c GGT = gama glutamiltransferase; ^d FA = fosfate alcalina.

5.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO SECO DE *C. scolymus*, EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS

5.3.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos e fêmeas, separados em quatro grupos iguais, um controle e três experimentais (n=10; 5 machos e 5 fêmeas), os quais receberam, respectivamente, as doses de 0g/kg (controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do extrato seco de *C. scolymus*, via oral, através de gavagem, durante 28 dias, conforme descrito no item 4.4.2. Os animais do grupo controle (CO) receberam água pelo mesmo período e via de administração.

Após o período de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia, procedendo-se a coleta do sangue, do timo e do baço para realização da fenotipagem, descritos no item 4.4.7.

5.3.2 Resultados

A tabela 8 mostra a porcentagem de linfócitos B e T, citotóxico (CD3+CD8+) e *helper* ou auxiliares (CD3+CD4+), esplênicos de ratos, machos e fêmeas, tratados com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. A análise estatística empregada revelou não haver diferença significativa entre os grupos, quando comparados ao grupo controle.

A tabela 9 mostra a porcentagem de linfócitos T, CD3+CD4-CD8-, CD3+CD4+CD8+, CD3-CD4+CD8+, CD3+CD4+ e CD3+CD8+ presentes no timo de ratos, machos e fêmeas, tratados com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. A análise estatística empregada revelou não haver diferença significativa entre os grupos, quando comparados ao grupo controle.

A tabela 10 mostra a porcentagem de linfócitos B e T, citotóxico (CD3+CD8+) e *helper* ou auxiliares (CD3+CD4+), presentes no sangue periférico de ratos, machos e fêmeas, tratados com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de: 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. A análise estatística empregada revelou não haver diferença significativa entre os grupos, quando comparados ao grupo controle.

Tabela 8 - Porcentagem de linfócitos B e T, citotóxico (CD3+CD8+) e *helper* ou auxiliares (CD3+CD4+), esplênicos em ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de: 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo. Os dados são apresentados como mediana (mínimo-máximo)

Linfócitos esplênicos		Controle	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
		(n=10)	1 (n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
B	♂	33,5	35,5	33,4	33,5
		(30,3-48,9)	(27,3-38,8)	(31,8-35,1)	(30,2-35,2)
	♀	24,5	33,8	33	27,5
		(22,2-34,4)	(23,9-35,8)	(30,1-40,8)	(15,5-30,6)
T citotóxico CD3+CD8+	♂	23,4	22,6	24,8	23,7
		(21,9-25,8)	(19,6-23,9)	(20,5-28,0)	(21,4-26,8)
	♀	24,3	24,3	24,6	23,0
		(21,9-24,8)	(23,4-27,4)	(18,8-27,5)	(22,6-28,1)
T <i>helper</i> CD3+CD4+	♂	56,8	53,5	55,5	57,8
		(50,0-59,5)	(52,0-59,8)	(53,6-58,7)	(54,2-59,7)
	♀	61,5	57,2	56,6	55,6
		(59,0-62,2)	(53,9-63,8)	(54,4-58,8)	(52,0-58,1)
Proporção T <i>helper</i> /T citotóxico (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)	♂	2,3	2,3	2,5	2,5
		(1,9-2,7)	(2,2-2,5)	(1,7-2,7)	(1,9-2,8)
	♀	2,5	2,3	2,2	2,3
		(1,8-2,8)	(1,8-2,6)	(1,9-2,5)	(1,9-2,7)

Fonte: (MATTOS, 2014).

Tabela 9 - Porcentagem de linfócitos T presentes no timo de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de: 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo. Os dados são apresentados como mediana (mínimo-máximo)

Fenotipagem de linfócitos (%)		Controle (n=10)	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
			1 (n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
CD3+CD4-CD8-	♂	2,0	1,3	1,4	1,1
		(0,9-2,6)	(0,7-1,7)	(0,7-4,0)	(0,6-1,8)
	♀	1,8	1,31	1,2	1,8
		(0,7-3,6)	(0,8-2,6)	(0,7-2,1)	(1,1-2,8)
CD3+CD4+CD8+	♂	52,6	58,2	67,7	64,4
		(33,1-79,7)	(56,8-70,6)	(49,4-74)	(52,7-70)
	♀	58,9	65,5	55,5	47,8
		(23,2-88,8)	(43,6-88,4)	(51,4-72,3)	(47,1-58,4)
CD3-CD4+CD8+	♂	71,4	78	64,3	72,2
		(57,6-80,6)	(68,1-80,7)	(41,3-79,4)	(54,2-83,9)
	♀	81,4	76,5	68,9	51,8
		(49-90,3)	(68,1-86)	(64,2-80,4)	(39,9-69,2)
T helper CD3+CD4+	♂	45,5	42,7	41,95	41,88
		(16,9-63,1)	(37,6-52,4)	(40,7-45,5)	(39,7-42,2)
	♀	37,8	36,4	36,7	35,1
		(29,1-45,7)	(29,3-42,4)	(31,7-42,6)	(28,8-42,1)
T citotóxico CD3+CD8+	♂	43,9	43,7	40,7	42,2
		(39,8-45,5)	(42,2-44,8)	(39,7-42,1)	(40,0-43,1)
	♀	43,9	43,9	42,6	47,9
		(41,4-45,0)	(41,7-44,4)	(39,0-45,1)	(39,6-48,2)
Proporção T helper/T citotóxico (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)	♂	1,0	0,9	1,0	0,9
		(0,7-1,2)	(0,6-1,2)	(0,6-1,1)	(0,7-1,2)
	♀	0,86	0,8	0,7	0,7
		(0,4-1,0)	(0,4-0,9)	(0,4-0,9)	(0,3-0,9)

Fonte: (MATTOS, 2014).

Tabela 10 - Porcentagem de linfócitos B e T, citotóxico (CD3+CD8+) e *helper* ou auxiliares (CD3+CD4+), presentes no sangue de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de: 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/k e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo. Os dados são apresentados como mediana (mínimo-máximo)

Fenotipagem de linfócitos (%)		Controle (n=10)	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
			1 (n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
B	♂	61	44,4	72,4	67,3
		(35,7-71,9)	(35,1-52,9)	(23,7-76)	(54,7-68,5)
	♀	71	56,4	75	54,2
		(56,9-69,8)	(53,7-61,5)	(64,1-81,9)	(12,2-70,4)
T <i>helper</i> CD3+CD4+	♂	76,6	76,1	74,3	71,4
		(61,8-79,1)	(70,6-77,6)	(60,9-77,2)	(70,4-76,1)
	♀	72,5	73,8	71,1	69
		(69,3-74,6)	(68,9-76,3)	(64,8-81,3)	(62,8-83,3)
T citotóxicoCD3+CD8+	♂	21	21,6	20	21,5
		(14,5-29,4)	(19,1-25,8)	(13,8-26,7)	(12,3-23)
	♀	21,9	22,2	21,1	19,8
		(19,3-23,8)	(19,6-26,4)	(9,44-28,2)	(12,9-29,1)
Proporção T <i>helper</i> /Tcitotóxico (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)	♂	3,5	3,6	3,6	3,5
		(2,9-3,9)	(3,1-3,8)	(3,0-3,9)	(2,9-3,7)
	♀	3,4	3,3	3,4	3,5
		(2,8-3,6)	(1,8-3,5)	(2,8-3,8)	(2,9-3,7)

Fonte: (MATTOS, 2014).

5.4 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T ANTÍGENO-ESPECÍFICA EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO SECO DE *C.scolymus*, EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS

5.4.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos e fêmeas, separados em quatro grupos iguais, um controle e três experimentais (n=10; 5 machos e 5 fêmeas), os quais receberam, respectivamente, as doses de 0g/kg (controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do extrato seco de *C.scolymus*, via oral, através de gavagem, durante 28 dias, conforme descrito no item 4.4.2. Os animais do grupo controle (CO) receberam água pelo mesmo período e via de administração.

Na última semana de tratamento, os animais foram imunizados com AT (anatoxina tetânica) e após sete dias, foram submetidos à eutanásia, procedendo-se a coleta do baço para avaliação dos linfócitos, conforme descrito no item 4.4.8.

5.4.2 Resultados

O gráfico 4 mostra a porcentagem de proliferação de linfócitos T de ratos, machos e fêmeas, tratados com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. A análise estatística empregada revelou não haver diferenças significantes entre os grupos tratados, quando comparados ao grupo controle.

Gráfico 4 - Porcentagem de proliferação de linfócitos T em ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (CO), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados cinco animais por grupo e por sexo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão

Fonte: (MATTOS, 2014).

5.5 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS PRESENTES NO SANGUE PERIFÉRICO E DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS ATRAVÉS DA MEDIDA DE “BURST” OXIDATIVO E FAGOCITOSE POR MEIO DE CITOMETRIA DE FLUXO, EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO SECO DE *C. scolymus*, EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS

5.5.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos e fêmeas, separados em quatro grupos iguais, um controle e três experimentais (n=10; 5 machos e 5 fêmeas), os quais receberam, respectivamente, as doses de 0g/kg (controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do extrato seco de *C. scolymus*, via oral, através de gavagem, durante 28 dias, conforme descrito no item 4.4.2. Os animais do grupo controle (CO) receberam água pelo mesmo período e via de administração.

Após o período de tratamento, os ratos foram submetidos aos procedimentos descritos no item 4.4.9 para avaliação dos neutrófilos e dos macrófagos peritoneais através do *burst* oxidativo e fagocitose.

5.5.2 Resultados

As tabelas 11 e 12 mostram, respectivamente, o *burst* oxidativo e fagocitose dos neutrófilos no sangue periférico dos ratos e dos macrófagos peritoneais, de machos e fêmeas, tratados com extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. A análise estatística empregada revelou não haver diferenças significantes entre os grupos tratados, quando comparados ao grupo controle.

Tabela 11 - *Burst* oxidativo e fagocitose dos neutrófilos sanguíneos de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. Foram empregados 5 animais por grupo e por sexo. Os dados representam a intensidade média de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão), correspondentes aos *gates* da população dos neutrófilos sanguíneos

		Controle	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
		(n=10)	1(n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
<i>Burst</i> basal (MFI)	♂	24,5 $\pm$ 3,0	28,9 $\pm$ 6,8	23,9 $\pm$ 10,1	37,9 $\pm$ 12,0
	♀	22,0 $\pm$ 2,7	22,6 $\pm$ 9,3	28,1 $\pm$ 8,6	34,1 $\pm$ 7,4
<i>Burst</i> induzido pela fagocitose (MFI)	♂	539,2 $\pm$ 96,9	500,0 $\pm$ 123,5	577,0 $\pm$ 169,2	417,6 $\pm$ 152,0
	♀	649,4 $\pm$ 106,7	554,6 $\pm$ 127,5	716,8 $\pm$ 202,8	685,4 $\pm$ 184,1
Fagocitose (%)	♂	653,2 $\pm$ 181,1	557,2 $\pm$ 78,8	627,4 $\pm$ 34,5	561,0 $\pm$ 167,1
	♀	576,8 $\pm$ 126,8	522,2 $\pm$ 64,0	419,6 $\pm$ 56,3	556,0 $\pm$ 195,0

Fonte: (MATTOS, 2014).

Tabela 12 – Fagocitose de macrófagos peritoneais de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg de peso vivo, durante 28 dias. Foram empregados 5 animais por grupo e por sexo. Os dados estão representados pela média $\pm$ desvio padrão

		Controle	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
		(n=10)	1(n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
<i>Burst</i> basal (MFI)	♂	109,5 $\pm$ 43,3	117,6 $\pm$ 23,9	166,8 $\pm$ 43,0	148,8 $\pm$ 36,9
	♀	237,4 $\pm$ 51,5	189,0 $\pm$ 27,3	218,6 $\pm$ 44,4	256,6 $\pm$ 26,5
<i>Burst</i> induzido pela fagocitose (MFI)	♂	216,0 $\pm$ 20,5	158,2 $\pm$ 33,0	162,8 $\pm$ 34,4	186,0 $\pm$ 20,0
	♀	289,6 $\pm$ 31,75	266,8 $\pm$ 25,6	234,0 $\pm$ 35,5	218,8 $\pm$ 57,9
Fagocitose (%)	♂	158,0 $\pm$ 27,2	132,8 $\pm$ 21,3	143,8 $\pm$ 24,4	147,4 $\pm$ 11,6
	♀	137,8 $\pm$ 15,3	147,8 $\pm$ 22,4	142,6 $\pm$ 8,8	144,0 $\pm$ 12,8

Fonte: (MATTOS, 2014).

5.6 EXPERIMENTO 6: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR ATRAVÉS DA TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SRBC (*SHEEP RED BLOOD CELLS*) EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO SECO DE *C.scolymus*, EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS

5.6.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos e fêmeas, separados em quatro grupos iguais, um controle e três experimentais (n=10; 5 machos e 5 fêmeas), os quais receberam, respectivamente, as doses de 0g/kg (controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do extrato seco de *C. scolymus*, via oral, através de gavagem, durante 28 dias, conforme descrito no item 4.4.2. Os animais do grupo controle (CO) receberam água pelo mesmo período e via de administração.

Após o período experimental, os ratos foram submetidos aos procedimentos descritos no item 4.4.10 para avaliação da titulação dos anticorpos anti-SRBC.

5.6.2 Resultados

A tabela 13 mostra os valores dos títulos de anticorpos anti-SRBC de ratos, machos e fêmeas, tratados com extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. A análise estatística empregada revelou não haver diferenças significantes entre os grupos, quando comparados ao grupo controle.

Tabela 13 - Titulação de anticorpos anti-SRBC de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg de peso vivo, durante 28 dias. Foram utilizados 5 animais por grupo e por sexo. Os dados estão representados pela média $\pm$ desvio padrão

		Controle	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
		(n= 10)	1 (n=10)	2 (n=10)	4 (n=10)
Títulos de anticorpos	♂	5,0 $\pm$ 0,0	5,2 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 0,8	5,6 $\pm$ 0,5
anti-SRBC* (Log ₂)	♀	5,0 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,7	4,8 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,5

Fonte: (MATTOS, 2014).

**Sheep Red Blood Cels.*

5.7 EXPERIMENTO 7: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR POR MEIO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (*DELAYED TYPE HYPERSENSIVITY* – DTH) EM RATOS TRATADOS COM O EXTRATO SECO DE *C.scolymus*, EM DOSES REPETIDAS, DURANTE 28 DIAS

5.7.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos e fêmeas, separados em quatro grupos iguais, um controle e três experimentais (n=10; 5 machos e 5 fêmeas), os quais receberam, respectivamente, as doses de 0g/kg (controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do extrato seco de *C.scolymus*, via oral, através de gavagem, durante 28 dias, conforme descrito no item 4.4.2. Os animais do grupo controle (CO) receberam água pelo mesmo período e via de administração.

Após o período de tratamento, os animais foram submetidos aos procedimentos descritos no item 4.4.11 para avaliação da resposta imune celular por DTH.

5.7.2 Resultados

O gráfico 5 mostra a avaliação da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) de ratos, machos e fêmeas, tratados com extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, durante 28 dias. A análise estatística empregada revelou haver diferenças entre os grupos tratados, quando comparados ao grupo controle ($P < 0,0001$, ANOVA). O pós teste de Dunnett apontou redução nos animais tratados com a dose de 4g/kg do extrato, verificada tanto em machos quanto em fêmeas, quando comparados ao grupo controle.

Gráfico 5 - Resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) de ratos, machos e fêmeas, tratados por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (CO), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg de peso vivo, durante 28 dias. Foram empregados 5 animais por grupo e por sexo

Fonte: (MATTOS, 2014).

* $p < 0,05$ versus grupo controle, ANOVA seguida do pós teste de Dunnett.

5.8 EXPERIMENTO 8: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO SECO DE *C.scolymus* À RATAS GESTANTES: ESTUDO DOS POSSÍVEIS EFEITOS TÓXICOS NA MÃE E NOS FETOS DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL

5.8.1 Delineamento experimental

Foram utilizadas 48 fêmeas prenhes que foram acasaladas conforme descrito no item 4.4.12. No dia de gestação 0, estas fêmeas foram pesadas e divididas em quatro grupos iguais (n=12, por grupo), as quais receberam, respectivamente, as doses de 0g/kg (controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do extrato seco de *C.scolymus*, via oral, através de gavagem. O tratamento foi feito do 6° ao 19° dias de gestação. Os animais do grupo controle (CO) receberam água pelo mesmo período e via de administração.

Durante a gestação foi feita a avaliação do peso materno e o consumo de água e de ração, assim como a avaliação clínica dos animais quanto a sinais de toxicidade, conforme descrito no item 4.4.13.

No 20° dia de gestação, as ratas foram anestesiadas e submetidas à cesariana, conforme descrito no item 4.4.15; neste momento procedeu-se a coleta de sangue para dosagem bioquímica (item 4.4.4) e a coleta de diferentes órgãos para avaliação histopatológica (item 4.4.6). Foi realizada a exposição dos cornos uterinos, para a contagem de pontos de implantações, de reabsorções, número de fetos vivos e mortos e em seguida a retirada das placentas e dos fetos para posterior análise morfológica dos mesmos. Os ovários também foram retirados para contagem de corpos lúteos, descritos no item 4.4.15.

Após a cesariana, os fetos foram contados no útero e este foi extraído inteiro e pesado. Posteriormente, os filhotes foram retirados do útero e examinados (item 4.4.16). Assim, os fetos e suas respectivas placentas, após secagem em papel toalha, foram pesados

individualmente e os filhotes mensurados quanto ao tamanho e encaminhados para análise óssea e visceral (item 4.4.17).

5.8.2 Resultados

A tabela 14 mostra o consumo de ração total (g) e de água total (ml) de ratas, tratadas com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. Em relação ao consumo de água, a análise estatística empregada revelou haver diferenças significantes entre os grupos, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$, ANOVA). O pós teste de Dunnett apontou aumento significativo no consumo de água nas ratas tratadas com 2g e 4g/kg, conforme ilustrado no gráfico 6.

Já em relação ao consumo de ração, a análise estatística empregada não revelou diferenças significantes entre os grupos, quando comparados ao grupo controle ($p = 0,2628$, ANOVA).

Com relação ao ganho de peso gestacional total, a análise estatística empregada revelou haver diferenças significantes entre os grupos, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$, ANOVA); o pós teste de Dunnett apontou diminuição significativa no ganho de peso total em todos os grupos tratados, quando comparadas ao grupo controle (tabela 15 e gráfico 7).

A tabela 16 mostra e a figura 7 ilustra, os parâmetros reprodutivos das ratas tratadas com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. Com relação ao peso materno (PM), a análise estatística empregada revelou haver diferenças significantes entre os grupos tratados, quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,0001$, ANOVA); o pós teste de Dunnett, apontou diminuição do peso materno em todos os grupos tratados com o extrato. Na análise do peso do útero (PU), o teste estatístico empregado revelou diferenças significantes ($p < 0,0001$, ANOVA); o pós teste de Dunnett, apontou diminuição significativa em todos os grupos tratados com o extrato. Na análise do peso fetal (PF) e do comprimento fetal (CF), o teste estatístico empregado revelou haver diferenças significantes nos grupos tratados, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$, ANOVA); o pós teste de Dunnett, apontou diminuição em todos os grupos tratados com o extrato (figura 9). Já em relação ao número de fetos vivos por ninhada (NFv), a análise

estatística empregada revelou haver diferenças significantes entre os grupos tratados, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0083$, ANOVA); o pós teste de Dunnett apontou diminuição do número de fetos vivos por ninhada no grupo tratado com a dose de 2 g/kg em relação ao grupo controle.

A tabela 17 mostra os parâmetros bioquímicos das ratas tratadas com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. A análise estatística empregada revelou haver diferenças significantes somente nos valores de ALT entre os grupos tratados, quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0004$, ANOVA); o pós teste de Dunnett apontou aumento significativo em todos os grupos tratados, quando comparados ao grupo controle, ilustrado no gráfico 8.

A tabela 18 mostra o resultado da análise óssea dos fetos (figura 8) das ratas tratadas com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação; a tabela mostra o número de fetos acometidos, o número de fetos avaliados e a porcentagem relativa à proporção de fetos acometidos e fetos avaliados. A análise estatística empregada revelou não haver diferença significativa entre os grupos experimentais e o controle, durante o período avaliado.

Em relação à análise visceral, dos fetos das ratas tratadas com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg, 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dia de gestação; a tabela mostra o número de fetos acometidos, o número de fetos avaliados e a porcentagem relativa à proporção de fetos acometidos e fetos avaliados. A análise estatística empregada revelou não haver diferença significativa entre os grupos experimentais e o controle, durante o período avaliado (tabela 19).

Tabela 14 - Consumo de ração total (g) e de água total (ml) de ratas, tratadas por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. São apresentados as médias e os respectivos desvios padrão; n = número de ratas por grupo

Consumo	Controle (n= 12)	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
		1 (n=12)	2 (n=12)	4 (n=12)
Ração total (g)	486,6 ± 7,8	490,4 ± 7,2	488,8 ± 8,5	484,2 ± 9,2
Água total (mL)	966,7 ± 13,7	962,5 ± 10,5	1062 ± 22,9***	1262 ± 16,4***

Fonte: (MATTOS, 2014).

***p<0,001 versus grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Gráfico 6 - Consumo de água total (ml) de ratas tratadas por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. Foram empregados 12 animais por grupo

Fonte: (MATTOS, 2014).

***p<0,001 versus grupo controle, ANOVA seguida do pós teste de Dunnett.

Tabela 15 - Ganho de peso gestacional total (gramas) de ratas, tratadas por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. São apresentados as médias e respectivos desvios padrão; n = número de ratas por grupo

	Controle (n=12)	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
		1 (n=12)	2 (n=12)	4 (n=12)
Ganho de peso total (g)	97,3 ± 10,2	83,6 ± 13,6**	76,1 ± 8,2***	77,1 ± 8,8***

Fonte: (MATTOS, 2014).

p<0,01; *p<0,001 *versus* grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Gráfico 7 - Ganho de peso gestacional total (g) de ratas, tratadas por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. Foram empregados 12 animais por grupo

Fonte: (MATTOS, 2014).

p<0,01; *p<0,001 *versus* grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Tabela 16 - Parâmetros reprodutivos de ratas tratadas por gavagem, com o extrato seco de *C.scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. São apresentados as médias e respectivos desvios padrão; medianas (mínimo-máximo); n = número de ratas por grupo

Dados Reprodutivos	Controle (n= 12)	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
		1 (n=12)	2 (n=12)	4 (n=12)
PM (g)	325,0 ± 15,2	286,0 ± 19,7***	287,4 ± 18,5***	288,1 ± 5,6***
PU (g)	76,6 ± 15,8	45,0 ± 7,0***	45,2 ± 6,4***	55,0 ± 16,0*
PP (g)	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
PF (g)	3,9 ± 1,4	2,4 ± 0,2***	2,4 ± 0,2***	2,4 ± 0,1***
CF (g)	3,7 ± 0,2	2,4 ± 0,0***	2,5 ± 0,0**	2,5 ± 0,1**
NFv	12,0 ± 1,2	10,5 ± 2,0	10,7 ± 1,4	9,6 ± 1,3**
SI (%)	100	95	95	90
	-	(90-100)	(90-100)	(80-100)
Fv (%)	100	94	75	95
	(86-100)	(86-100)	(50-100)	(90-100)
Pré-I (%)	0	0	0	0
	-	(0-24,9)	(0-70)	(0-10)
Pós-I (%)	0	11,8	33,3	4,5
	-	(0-18,1)	(0-66,6)	(0-20)

Fonte: (MATTOS, 2014).

PM: peso materno no 20º dia de gestação; PU: peso do útero; PP: peso placentário por ninhada; PF: peso fetal por ninhada; CF: comprimento fetal por ninhada; NFv: número de fetos vivos por ninhada; SI: sítios de implantação por ninhada; Fv: porcentagem de fetos vivos por ninhada; Pré-I: perda pré-implantação por ninhada; Pós-I: perda pós-implantação por ninhada.

*p<0,05, **p<0,01; ***p,0,001 versus grupo controle, ANOVA seguida do pós teste de Dunnett.

Figura 7 - Parâmetros reprodutivos de ratas, tratadas por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. Foram empregados 12 animais por grupo

Fonte: (MATTOS, 2014).

PM: peso materno no 19º dia de gestação; PU: peso do útero; PF: peso fetal por ninhada; CF: comprimento fetal por ninhada; NFv: número de fetos vivos por ninhada.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus grupo controle, ANOVA seguida do pós teste de Dunnett (dados paramétricos) e Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn (dados não paramétricos).

Tabela 17 - Parâmetros bioquímicos de ratas, tratadas por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. São apresentados as médias e respectivos desvios padrão; n = animais por grupo

Parâmetros Bioquímicos	Controle (n= 12)	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
		1 (n=12)	2 (n=12)	4 (n=12)
AST (U/L)	152,6 ± 15,8	172,5 ± 31,7	152,9 ± 49,3	179,0 ± 49,3
ALT (U/L)	63,0 ± 13,1	83,0 ± 8,6*	83,0 ± 25,2*	82,3 ± 21,8*
GGT (U/L)	1,2 ± 1,1	1,4 ± 1,0	1,4 ± 1,2	2,6 ± 0,5
FA (U/L)	99,2 ± 34,8	78,3 ± 12,3	81,7 ± 12,4	80,3 ± 4,1
Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0
Uréia (mg/dL)	49,5 ± 9,5	52,8 ± 7,1	50,2 ± 12,5	49,3 ± 3,0
Colesterol (mg/dL)	71,6 ± 8,7	70,0 ± 11,0	67,5 ± 11,0	66,0 ± 6,0

Fonte: (MATTOS, 2014).

AST = asparatato aminotransferase; ALT =alanina aminotransferase; GGT =gama glutamiltransferase; FA = fosfate alcalina.

* p<0,05 versus grupo controle, Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn.

Gráfico 8 – Dosagem de ALT de ratas tratadas por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. São apresentados as médias e respectivos desvios padrão. Foram empregados 12 animais por grupo

Fonte: (MATTOS, 2014).

*p<0,05 versus grupo controle, Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn.

Tabela 18 – Análise óssea dos fetos de ratas, tratadas por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. São apresentados o número de fetos acometidos, o número de fetos avaliados e a porcentagem relativa à proporção de fetos acometidos e fetos avaliados

Exame Fetal	Controle	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
	(12) ^a	1 (12) ^a	2 (12) ^a	4 (12) ^a
Malformações esqueléticas (%)	0 ^b (24) ^c 0	0 ^b (24) ^c 0	0 ^b (24) ^c 0	0 ^b (24) ^c 0
Costela ondulada (%)	2 ^b (24) ^c 8,3	3 ^b (24) ^c 12,5	3 ^b (24) ^c 12,5	4 ^b (24) ^c 16,6
Parietais com ossificação incompleta (%)	4 ^b (24) ^c 16,6	5 ^b (24) ^c 20,8	5 ^b (24) ^c 20,8	6 ^b (24) ^c 25
Esterno com ossificação incompleta (%)	2 ^b (24) ^c 8,3	4 ^b (24) ^c 16,6	4 ^b (24) ^c 16,6	6 ^b (24) ^c 25
Esterno com forma irregular (%)	1 ^b (24) ^c 4,1	2 ^b (24) ^c 8,3	3 ^b (24) ^c 12,5	3 ^b (24) ^c 12,5

Fonte: (MATTOS, 2014).

^a Número de ninhadas; ^b Número de fetos acometidos; ^c Número de fetos avaliados

Figura 8 – Fetos prontos para a análise óssea, corados com alizarina vermelha

Fonte: (MATTOS, 2014).

Tabela 19 – Análise visceral dos fetos de ratas tratadas por gavagem, com o extrato seco de *C. scolymus*, nas doses de 0g/kg (Controle), 1g/kg, 2g/kg e 4g/kg, do 6º ao 19º dias de gestação. São apresentados o número de fetos acometidos, o número de fetos avaliados e a porcentagem relativa à proporção de fetos acometidos e fetos avaliados

Exame Visceral	Controle	<i>Cynara scolymus</i> (g/kg/dia)		
	(12) ^a	1 (12) ^a	2 (12) ^a	4 (12) ^a
Malformações viscerais (%)	0 ^b (24) ^c 0	0 ^b (24) ^c 0	0 ^b (24) ^c 0	0 ^b (24) ^c 0
Hemorragia peritoneal (%)	1 ^b (24) ^c 4,1	1 ^b (24) ^c 4,1	0 ^b (24) ^c 0	1 ^b (24) ^c 4,1
Ausência de órgãos (%)	0 ^b (24) ^c 0	0 ^b (24) ^c 0	0 ^b (24) ^c 0	0 ^b (24) ^c 0

Fonte: (MATTOS, 2014).

^aNúmero de ninhadas; ^b Número de fetos acometidos; ^c Número de fetos avaliados.

Figura 9 – Diferença do comprimento fetal (CF) dos fetos com 20º dias de gestação

Fonte: (MATTOS, 2014).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os fitoterápicos têm conquistado cada vez mais espaço no mercado de medicamentos devido ao seu baixo custo em relação aos sintéticos, à facilidade de aquisição e, principalmente, pela cultura popular em considerá-los como “medicamentos naturais” e, por isto, tem-se a crença de que não promovam efeitos indesejados. Porém, a utilização de fitoterápicos, plantas medicinais, ou qualquer outro tipo de fármaco à base de plantas, deve ser realizada de maneira orientada e os cuidados a serem tomados no seu uso são os mesmos como o de qualquer outro medicamento. Por esta razão, é fundamental a realização de controle sanitário destes produtos, conscientização da população quanto aos cuidados na sua utilização e, principalmente, a avaliação, por meio de testes, já bem determinados, da mesma maneira que se exige de medicamentos convencionais, para comprovar a segurança do uso de tais substâncias (CARVALHO et al., 2008).

A importância desta pesquisa aumenta ainda mais, haja vista que, atualmente, existem no Brasil diversos medicamentos fitoterápicos à base de extrato seco da alcachofra que são facilmente encontrados para venda, em qualquer farmácia e mesmo por meio das redes de computadores; portanto, de livre acesso à população. Muito recentemente a ANVISA, por meio da RDC 26 de 13 de maio de 2014 (BRASIL, 2014), considerou a *C.scolymus* como “produto tradicional fitoterápico”, e assim sendo, a “comprovação de uso seguro e efetivo para um período mínimo de 30 anos”, o que permite que medicamentos fitoterápicos à base desta planta, possam ser registrados naquela Agência. Vale ressaltar que a comprovação requerida não se faz por meio científico e sim pelo tempo de uso pela população.

Embora existam vários estudos que relatem os efeitos benéficos da *C. scolymus* em seres humanos, bem como estudos fitoquímicos, que caracterizam os componentes dos extratos e o princípio ativo (NOLDIN et al., 2003; RONDANELLI et al., 2011), escassas são as pesquisas relativas à avaliação de sua toxicidade. No que tange aos estudos de toxicologia reprodutiva, pode-se considerar inexistente, haja vista que uma ampla busca na literatura não revela qualquer estudo relacionando à toxicidade direta em machos, fêmeas,

no conceito ou prole de gestantes ou lactantes expostas à planta; apenas é citado que a presença da substância cinaropicrina é responsável pelo gosto amargo e, por isso a planta não deve ser ingerida por gestantes lactentes, uma vez que este princípio é veiculado através do leite. Assim, não se encontra nenhuma pesquisa dedicada à avaliação da toxicidade da *C.scolymus* e/ou de seus princípios ativos. Considerando-se os estudos de imunotoxicidade, da mesma forma, nenhuma pesquisa foi encontrada relacionando os efeitos da alcachofra.

Devido à escassez de estudos sobre a toxicidade da *C.scolymus*, para a definição das doses do extrato que seriam utilizadas neste trabalho, valeu-se, como base, da dosagem recomendada e empregada com finalidade terapêutica pela população, propostas nas bulas dos medicamentos fitoterápicos à base de extrato seco da planta. Assim, a pesquisa, em diversas fontes bibliográficas, mostrou que a maioria dos medicamentos fitoterápicos que contém *C.scolymus*, indica a administração diária de 2g, sendo, portanto, esta, a escolhida para ser a dose intermediária. Optou-se, ainda, pelas doses de 1g e 4g. Desta maneira, 1g, 2g e 4g equivaleriam, respectivamente, à menor, à intermediária e à maior dose desta planta, como preconizado no protocolo de avaliação de toxicidade de várias agências oficiais de regulamentação (WHO, 1967; OECD, 1998).

Extratos vegetais secos, por serem preparações mais potentes do que as plantas que lhes deram origem, têm sido muito utilizados como produtos finais e intermediários na obtenção de diferentes formas farmacêuticas, com a função de proporcionar, em pequenas quantidades, uma forma física estável, mantendo todas as características estruturais da planta (COSTA et al., 2009) e, portanto, é fundamental que se tenha a caracterização química desses extratos e a obtenção de marcadores ou padrões de referências.

Para a garantia da qualidade do produto, sua eficácia e até mesmo segurança, é imprescindível que análises nos extratos sejam realizadas de maneira qualitativa e quantitativa para determinar as substâncias existentes, mensurar as impurezas e se certificar da presença do princípio ativo e sua quantidade. Vale lembrar que as concentrações de princípios ativos presentes nas plantas podem variar devido a fatores

ambientais, como a precipitação pluviométrica, umidade e temperatura ambiente. (HARAGUCHI; GÓRNIK, 2008).

Segundo vários estudos fitoquímicos, os principais componentes presentes na *C.scolymus* são os ácidos fenólicos (ácido cafeoilquínico, expresso em ácido clorogênico e cinarina), flavonóides (luteolina, cinarosídeo, escolimosídeo) e sesquiterpenos (cinaropicrina) (BLUMENTHAL; GOLBERG; BRINCKMANN, 2000).

Na análise qualitativa do extrato seco de *C.scolymus*, na presente pesquisa, foi possível verificar a presença de cinarina, já identificada há muito tempo como um dos principais componentes responsáveis pelos efeitos farmacológicos da planta (TESKE; TRENTINI, 2001). O extrato aqui empregado, segundo informações do fornecedor, está padronizado em, no mínimo, 0,5% de cinarina; no entanto, os resultados quantitativos realizados na presente pesquisa mostraram que este extrato apresentava 3,7% deste princípio ativo, ou seja, numa concentração ao redor de sete vezes maior do que o mínimo indicado pela empresa. Como não há estudos de toxicidade destes princípios ativos, deve ser analisado que uma elevada concentração do mesmo poderia causar toxicidade. Portanto, uma importante consideração que deve ser feita se refere à necessidade de se padronizar, não somente as quantidades mínimas, mas também as máximas dos marcadores presentes no fitoterápico.

Outro fato oportuno a ser destacado está relacionado ao marcador empregado pela empresa que comercializou o material vegetal utilizado neste estudo. Segundo a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2011), devem ser usados como marcadores os derivados do ácido cafeoilquínico, expresso em ácido clorogênico e não de cinarina; portanto, o extrato comercializado por esta empresa para a confecção deste fitoterápico no país, está em desacordo com o que é preconizado pela ANVISA.

A cinaropicrina é descrita por ser a substância majoritária nas folhas de *C. scolymus* do Brasil (NOLDIN et al., 2003); porém, na presente pesquisa encontrou-se apenas “traços” desta substância no extrato da planta. Uma possibilidade seria a pouca concentração deste princípio ativo nas variedades de alcachofra do nosso país. É possível

ainda que tenha havido a perda de cinaropictina durante o processo de retirada da água da planta. De fato, segundo Simões (1999), a composição do extrato vegetal depende da forma de secagem das folhas e do seu processo de extração, podendo ocorrer hidrólise e transesterificações em meio aquoso e alguns componentes podem não ser detectados. Como foram tão baixos os níveis desta substância encontrada nessas amostras, desconsiderou-se os possíveis efeitos da cinaropictina neste estudo.

Segundo Rondanelli et al. (2011), os efeitos benéficos dos extratos de *C. scolymus* na redução dos níveis de glicose já foram demonstrados em diversos estudos em animais de laboratório. Algumas avaliações, *in vitro*, também demonstram essa atividade hipoglicemiante (FANTINI; COLOMBO; GIORI, 2010). Uma pesquisa conduzida por Rondanelli et al. (2011), mostra que o extrato de *C. scolymus*, juntamente com o extrato de *Phaseolus Vulgaris*, o feijão, reduziu significativamente os níveis sanguíneos de glicose em pacientes que estavam em situação de sobrepeso. Porém, na presente pesquisa, os dados obtidos revelaram que houve uma queda mínima na glicemia sanguínea, sem qualquer significância biológica ou estatística, o que discorda de outros estudos. Embora pouco possa ser teorizado neste momento sobre a discrepância entre esses resultados, um possível fator seria a amostra de *C. scolymus* aqui empregada, que poderia ter menor quantidade de princípio(s) ativo(s) hipoglicemiante(s); deve ainda ser considerado o tempo de tratamento e a dose de planta empregada, bem como a espécie animal avaliada (isto é, pesquisas em humanos e ratos).

A literatura mostra vários estudos que aludem aos efeitos hipocolesterolêmicos da alcachofra (KRAFT, 1997; ENGLISH et al., 2000; THOMPSON COON; HERNST, 2003). Assim, a planta é relatada como inibidora da biossíntese do colesterol nos hepatócitos (GEBHARDT, 1998). Por outro lado, os dados aqui obtidos não revelaram diminuição significativa nos níveis de colesterol sanguíneo. Resultado semelhante foi verificado por Kusku-Kiraz et al. (2010), estudando os efeitos hipocolesterolêmicos do extrato de *C. scolymus*, em ratos, que receberam a planta, durante 14 dias, e não encontraram alteração nos níveis de lipídeos do soro e nas frações de colesterol avaliadas,

LDL (“*Low Density Lipoprotein*”) e VLDL (“*Very Low Density Lipoprotein*”) – ambas denominadas de “colesterol ruim”.

Existem muitos estudos sobre a cinarina, apontada como o mais importante princípio ativo da *C.scolymus*. Desta maneira, para muitos autores, este composto é o principal responsável pelos efeitos hipocolesterolêmiantes e hipolipidêmico, quando administrado nas doses entre 60 – 1500mg (HECKERS et al., 1977; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996). Por outro lado, existem pesquisas que não verificaram tais efeitos benéficos. Em um desses estudos, pacientes humanos que apresentavam hiperlipoproteinemia, recebendo doses entre 250 mg a 750 mg por dia de cinarina, durante 12 semanas, não mostraram diminuição significativa dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos. Segundo Gebhardt (1998), a luteolina seria o composto responsável pela inibição da proteína HMG-CoA-redutase, enzima que participa da síntese do colesterol, e que, os outros compostos, como a cinarina e o ácido clorogênico (ACG), entre outros, não apresentam influência significativa neste parâmetro. Portanto, embora sejam atribuídos os efeitos hipocolesterolêmiantes da *C.scolymus* e da cinarina, seriam necessários mais estudos para efetivamente comprovar tal hipótese e se assim fosse constatado, será necessário padronizar a posologia (dose e intervalo de administração), bem como o tempo de tratamento necessário para se obter tais efeitos.

Embora haja farta documentação científica apontando para os efeitos medicinais da alcachofra, como já aqui afirmado, escassos são os estudos relativos à avaliação de toxicidade da *C. scolymus*. Numa destas raras pesquisas, Mello, Mello e Langeloh (2008), propuseram verificar, em ratos e coelhos, os possíveis efeitos tóxicos da administração, em doses repetidas, durante 30 dias, de um fitoterápico no qual dentre os oito componentes ativos figurava a alcachofra. Neste estudo observou-se que embora tenha sido administrada uma dose 10 vezes maior que aquela terapêutica preconizada, não foi detectado nenhum sinal de toxicidade no composto fitoterápico testado. No entanto, deve-se considerar que foram avaliados apenas os efeitos gerais da toxicidade (observação clínica, hemograma, bioquímica e histopatologia); além disso, no composto fitoterápico

estudado havia mais outros sete componentes vegetais. Portanto, pouco poderia ser concluído quanto à toxicidade da *C.scolymus*. Assim, o presente estudo reveste-se de grande importância, tanto pela avaliação exclusiva da planta, bem como pelos diferentes protocolos de toxicidade aqui empregados.

A toxicidade sistêmica se manifesta por meio da redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem, como a presença de pêlos arrepiados (MELO, 2001), além da redução na massa corporal dos animais experimentais (TOFOVIC; JACKSON, 1999; RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002) e de alterações hematológicas e da bioquímica sanguínea (GONZALEZ; SILVA, 2003). Os dados obtidos nesta pesquisa, provenientes do peso, do consumo de água e de ração, mostraram que em nenhum dos ratos, dos diferentes grupos tratados com a planta, houve variação em relação àqueles animais do grupo controle. Da mesma forma, não se observou qualquer alteração clínica durante todo o tratamento de 28 dias. Além disso, o hemograma e bioquímica sérica dos ratos, dos diferentes grupos avaliados, também se mostraram dentro das variações fisiológicas normais para esta espécie (SANTOS et al., 2010).

Os efeitos tóxicos de substâncias, segundo Mendes (1988), podem atingir vários órgãos, mas o fígado é, normalmente, o mais afetado devido a sua posição anatômica e sua importância funcional. Sinais de hepatotoxicidade podem ser identificados quando se verifica anormalidades nas atividades séricas das enzimas hepáticas e também, na diminuição nos níveis de proteínas totais e albumina (JURADO; MATTIX, 1998). Elevações nas atividades séricas enzimáticas podem estar relacionadas a alterações reversíveis ou irreversíveis na membrana celular, indução de enzimas microssomais ou lesões estruturais associadas à necrose, colestase ou isquemia hepatocelular (SHARON; CENTER, 1995). Na presente pesquisa, todos estes parâmetros enzimáticos encontravam-se dentro do padrão de normalidade em todos os grupos de ratos estudados.

O extrato de *C. scolymus* é considerado colerético, melhorando a excreção biliar e a conversão biliar (JOY; HABER, 2007). A bilirrubina é um pigmento resultante do

catabolismo da hemoglobina após a destruição das hemácias pelo sistema retículo endotelial; no interior do hepatócito ocorre a conjugação da bilirrubina com o ácido glicurônico, sob a ação da glicuroniltransferase. Desta maneira, a bilirrubina pode ser encontrada no plasma sob a forma conjugada (ligada à albumina - direta) e não-conjugada (bilirrubina livre - indireta) (DAL MORO; SILVESTRI; SILVA, 2004). Quando há aumento dos níveis de bilirrubinas no soro, pode-se suspeitar de lesão hepática, obstrução biliar ou até mesmo aumento na velocidade de destruição de hemoglobinas. O aumento nos níveis de bilirrubina indireta poderia ser devido a, por exemplo, uma síndrome hemolítica; por outro lado, o aumento da bilirrubina direta poderia ser um indicativo de hepatite, aguda ou crônica, reações tóxicas a várias drogas e obstrução do trato biliar (HORSFALL et al., 2011).

Dado interessante neste estudo foi aquele relacionado à avaliação da bilirrubina; assim, embora as alterações observadas nos níveis destas substâncias não fossem estatisticamente significantes, notou-se aumento nos níveis de bilirrubina, direta e indireta, em todas as doses do extrato seco de *C.scolymus* utilizado. No entanto, estes dados *per se* não permitiriam sugerir alguma toxicidade; para tal, seria necessário realizar outros estudos, por exemplo, prolongando-se o tempo de administração da planta (90 dias) ou então aumentando a concentração de *C.scolymus* administrada, avaliando-se, assim, se haveria aumento dos valores da bilirrubina, bem como outros dados clínicos que corroborassem tal suspeita.

Portanto, reunindo-se os dados bioquímicos, tanto em relação às enzimas avaliadas, os valores de bilirrubina, direta indireta e total, bem como os dados provenientes do estudo histopatológico do parênquima hepático, pôde-se concluir que a *C.scolymus*, nas doses aqui empregadas, não promoveu efeito hepatotóxico.

O rim é o segundo órgão mais afetado por qualquer substância, devido primeiramente às suas características anatômicas e funcionais, visto que, 25% do débito cardíaco são direcionados para o órgão, promovendo o alto fluxo sanguíneo renal, o que favorece a alta concentração de substâncias tóxicas e seus metabólitos no tecido, por ser uma via

obrigatória de eliminação de xenobióticos (PERAZELLA, 2009). Devido a estes fatos, poderá haver acúmulo de compostos tóxicos neste órgão levando a um quadro de nefrotoxicidade (BLEDSOE et al., 2008).

Níveis séricos de uréia e de creatinina são muitas vezes utilizados como um indicador da função renal e glomerular, estando estes aumentados em lesões renais (LANGMAN; KAPUR, 2006). Na presente pesquisa, verificou-se que o extrato seco de *C. scolymus* não alterou nenhum destes parâmetros. Além disso, a avaliação histopatológica também não mostrou alterações significantes, o que permite concluir que, da mesma maneira que o verificado no fígado, a *C.scolymus* não apresenta toxicidade renal. Vale observar que um estudo conduzido por Teske e Trentini (1995), relatou que a *C.scolymus* apresenta atividade diurética, auxiliando na eliminação de uréia e substâncias tóxicas de correntes do metabolismo celular; assim sendo, pesquisas futuras poderiam avaliar se esta planta não apresentaria algum efeito protetor da função renal frente a alguns agentes nefrotóxicos já bem conhecidos.

A imunotoxicologia estuda a ação deletéria de diversos agentes físicos e químicos sobre o sistema imune. É uma ciência recente, pois foi somente a partir da década de 1970 que estudos mais aprofundados passaram a ser desenvolvidos, verificando-se os efeitos de vários xenobióticos, tais como o cádmio (COOK; HOFFMAN; DI LUZIO, 1975), bifenis policlorados (LEE; CHANG, 1985), o 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina-TCDD (LEWIS; ADAMS, 1985), entre tantos outros, inclusive plantas tóxicas e medicinais (HUEZA; PALERMO-NETO, 2008) passíveis de promover alguma ação tóxica sobre o sistema imunológico. Portanto, a partir dos resultados verificados em diversos estudos, revelando que há vários compostos capazes de interferirem no sistema imune, as agências internacionais de normatização, tais como a *US Environmental Protection Agency (USEPA)*, *U.S Food and Drug Administration (US-FDA)* e a *OECD* resolveram incorporar em seus protocolos de avaliação de risco toxicológico de xenobióticos de interesse humano, ensaios sobre imunotoxicidade (LUSTER et al., 1988).

Sinais de imunotoxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos linfóides e pela análise de sua celularidade (GONZALEZ; SILVA, 2003). O timo, responsável pela maturação de linfócitos, o baço e os linfonodos, onde ocorre a diferenciação e proliferação celular, são os órgãos frequentemente utilizados para esse tipo de avaliação de toxicidade no sistema imune. Segundo Suttie (2006), o baço é considerado um dos órgãos alvo para toxicidade e parâmetros gerais, como o peso relativo deste órgão, que possui papel importante como indicador de ocorrência de imunotoxicidade (DE JONG; VAN LOVEREN, 2007).

Na presente pesquisa, na avaliação esplênica dos animais tratados com as diferentes doses do extrato seco de *C. scolymus*, observou-se o aumento do peso relativo e da celularidade do baço naqueles ratos submetidos ao tratamento com a maior dose do extrato da planta. Segundo Nüßlein et al. (2009), a esplenomegalia pode ser induzida por várias anormalidades, como anemia hemolítica, infecções, doenças mieloproliferativas ou hipertensão portal devido à doença hepática; a esplenomegalia é ainda bastante relatada em casos de intoxicações por plantas (SONNE et al., 2011) e até mesmo por cebola comum (VALLI, 1993).

Por outro lado, deve-se considerar que alterações estruturais e/ou funcionais de órgãos linfóides, como massa relativa e celularidade, possam estar relacionados a alteração anatômica e não à estimulação do sistema imune. Portanto, uma hipótese que poderia justificar estes achados seria a produção, pela planta, de uma congestão esplênica devido, por exemplo, a um efeito vasodilatador em vasos de médio e grande calibre, por algum componente da planta.

Os linfócitos são as únicas células do organismo capazes de reconhecer e distinguir, de modo específico, diversos determinantes antigênicos e são responsáveis pela especificidade e memória, características importantes da resposta imune adaptativa ou específica (ABBAS; LICHMAN; PILLAI, 2008). Quando em contato com um agente agressor (antígeno) ao organismo, interagem com este sofrendo diversas alterações funcionais na tentativa de proteger e eliminar a agressão. Segundo Prado et al. (2007), quando o sistema

imune está frente à uma ameaça, ocorre aumento no número de linfócitos e, consequente, aumento na proliferação de linfócitos T.

Nos estudos relativos à avaliação de linfócitos, aqui realizados, não foi encontrada nenhuma alteração significativa nos linfócitos T. Por outro lado, uma pesquisa, *in vitro*, realizada por Dong et al. (2009), mostrou que a cinarina apresentou potencial agente imunossupressor, sendo que este efeito seria por meio do bloqueio do receptor CD28 das células T. Neste momento não poderia ser especulado o porquê da divergência de resultados, haja vista que, ao contrário daquele estudo, esta pesquisa avaliou o extrato da planta inteira e não somente a cinarina; portanto, outros tantos componentes poderiam interferir; além disto, ao contrário do estudo anterior com a cinarina, este foi realizado *in vivo*. Assim, pode-se apenas concluir que o extrato da *C.scolymus* não promoveu a alteração da resposta imune adaptativa.

Ainda, nos estudos de imunotoxicidade, também são avaliadas as células envolvidas diretamente na resposta imune inata, como os macrófagos e neutrófilos, já que várias pesquisas evidenciaram a ação de imunotóxicos sobre o metabolismo destas células, levando a perturbações nos mecanismos de defesa e na produção de espécies reativas de oxigênio (HUEZA et al., 2007; KOVACIC; SOMANATHAN, 2008).

Os flavonóides, presentes na *C. scolymus*, destacam-se por diversas atividades, dentre elas antitumorais e antiinflamatórias (PIETTA, 2000) e também, podem influenciar na resposta imune, alterando a atividade de macrófagos e neutrófilos (GARCIA-LAFUENTE et al., 2009). Neste sentido, Leal et al. (1998) propõem que a atividade antitumoral dos flavonóides está relacionada ao aumento na atividade dos fagócitos, aumentando a fagocitose e contribuindo, então, na redução dos tumores. Mileo et al. (2012), comprovaram esse efeito antitumoral do extrato de *C. scolymus*, em um estudo, *in vitro*, realizado com células do câncer de mama, no qual houve redução na quantidade de células tumorais e redução na metástase pelo extrato. De fato, plantas que contêm flavonóides, demonstram efeito estimulante do sistema imune, estimulando a fagocitose de macrófagos (CARLOS et al., 2005).

Os dados aqui obtidos, no entanto, revelaram que tal atividade não foi observada e, ao contrário, verificou-se que ratos machos, de todos os grupos experimentais e, fêmeas que receberam a maior dose do extrato de *C.scolymus*, apresentaram queda no *burst* oxidativo induzido pela fagocitose. Neste momento, não seria possível levantar qualquer conjectura sobre este resultado, até porque não foram encontradas alterações no *burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos, dos ratos, machos e fêmeas tratados com a planta. Além disto, nesta pesquisa, não foram determinados os níveis de flavonóides (luteolina, cinarosídeo, escolimosídeo) presentes no extrato, justamente aqueles princípios aos quais se atribui o efeito imunoestimulante. Portanto, estudos visando a avaliação da atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos de animais submetidos ao tratamento com grupos isolados destes flavonóides muito contribuirão para melhor interpretar estes dados.

A reação de hipersensibilidade tardia (DTH) é considerada o melhor modelo *in vivo* para avaliar a resposta imune em ratos (CÓRDOBA et al., 2008). A resposta inicia-se após a migração dos linfócitos (Th1) para o local infectado com o antígeno, onde há um aumento na produção e secreção de citocinas inflamatórias; os macrófagos destroem esse antígeno provocando uma reação inflamatória local com presença de edema, que irá regredir em até 72 horas após o contato com o antígeno (KOBAYASHI; KANEDA; KASAMA, 2001).

No presente estudo, os animais, machos e fêmeas, tratados com a maior dose do extrato seco de *C.scolymus*, apresentaram diminuição no edema. Tal efeito poderia estar relacionado à presença do ACG no extrato da *C.scolymus*. Tal suposição é embasada no estudo conduzido por Marrasini et al. (2010), no qual relatam a diminuição no edema de pata, induzido pela carragenina, em camundongos, após tratamento com o ACG. Além disso, pesquisas, empregando-se diferentes modelos experimentais de inflamação, também verificaram que o ACG promove diminuição de células inflamatórias para o foco da inflamação (DOS SANTOS et al., 2006; XU et al., 2008; ZHANG et al., 2010), por meio de seus efeitos antioxidantes, inibindo as espécies reativas de oxigênio (CHANG et al.,

2009; ZHANG et al., 2010); bem como sua ação sobre a produção e secreção de mediadores inflamatórios (ZHAU et al., 2008; HAN et al., 2010).

Ainda, um estudo realizado por Belinati (2010), em ratos, demonstrou que o ACG apresentou efeito direto nos neutrófilos e nos macrófagos, responsáveis pela migração em direção ao estímulo inflamatório e adesão vascular. Portanto, com base nestes dados de literatura, é possível teorizar que o ACG presente no extrato da *C.scolymus* tenha sido o responsável pela inibição de macrófagos para o foco da inflamação e, assim, produzindo diminuição da permeabilidade vascular e consequente queda do edema local. No entanto, estudos fitoquímicos devem ser realizados para verificar a concentração deste composto na alcachofra.

Outro protocolo imunotoxicológico da *C.scolymus* aqui empregado foi a avaliação da resposta imune humoral, por meio da detecção de títulos de anticorpos anti-SRBC, por ser uma das metodologias preconizadas pelo FDA e pela OECD (LUSTER et al., 1988). No entanto, tal estudo revelou não haver qualquer alteração nos níveis de anticorpos, em nenhum dos grupos avaliados.

Reunindo-se todos os dados relativos à avaliação do sistema imune, pode-se concluir que, embora os resultados obtidos neste estudo não permitam inferir que a *C.scolymus* possua efeito imunoestimulante, foi possível verificar que a planta não apresenta efeitos imunotóxicos.

A Regulamentação brasileira exige que medicamentos fitoterápicos tenham sua eficácia e segurança comprovadas, inclusive para uso na gravidez e lactação (BRASIL, 2004a). Gestantes constituem um grupo populacional, que utilizam frequentemente plantas medicinais, principalmente por acreditarem que estes medicamentos são “naturais” e não causam danos ao feto ou ao neonato; portanto, é comum substituição de medicamentos convencionais por fitoterápicos pela gestante (WEIER; BEAL, 2004). Por outro lado, sabe-se que diversas plantas medicinais deveriam ser evitadas durante o período gestacional por apresentarem efeitos teratogênicos, embriotóxicos e abortivo. Neste sentido, um levantamento realizado por Rodrigues et al. (2011), no qual procedeu-se a uma busca em

bases eletrônicas de dados (MEDLINE, PubMed, LILACS) por plantas que apresentassem efeitos embriotóxicos, teratogênicos e abortivos comprovados, mostrou que plantas amplamente utilizadas no país, como Arnica (*Arnica montana*), Artemísia (*Artemisia vulgaris*), Arruda (*Ruta chalepensis/Ruta graveolens*), Barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*), Boldo (*Vernonia condensata*) dentre outras, mas não a *C.scolymus*, apresentavam algum indício de toxicidade durante o período perinatal. Dessa forma, acredita-se que estudos na esfera reprodutiva com medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais se revestem de grande importância; para tanto, neste trabalho incluiu-se a avaliação da teratogenicidade da *C.scolymus*.

O risco teratológico existe durante todo período gestacional, no entanto é maior na fase de embriogênese, quando ocorrem a diferenciação tecidual e organogênese. A administração do extrato seco de *C. scolymus* ocorreu do 6º ao 19º dia de gestação da rata, período em que já ocorreu a implantação embrionária no útero (BERNARDI, 2011), evitando-se, desta maneira, a possibilidade de toxicidade pré-implantação, sendo avaliado, portanto, neste estudo, os efeitos da planta durante o período de organogênese e desenvolvimento fetal.

Efeitos tóxicos de substâncias químicas no período perinatal podem ser identificados por meio da redução do peso corporal materno e da sua prole (STEVENS; GALLO, 1989); além disto, a desnutrição durante a gestação de ratas também pode causar retardo no desenvolvimento fetal (FLEEMAN et al., 2005; ZHANG et al., 2010).

Nenhuma alteração comportamental ou clínica foi observada durante o tratamento com o extrato seco de *C. scolymus*. Por outro lado, verificou-se queda no ganho de peso total naquelas ratas submetidas ao tratamento com a planta, nas três doses empregadas, embora estas fêmeas não tenham diminuído o consumo de ração durante o período gestacional avaliado.

Fato interessante observado foi a detecção do aumento no consumo de água também nas gestantes tratadas com as maiores doses do extrato utilizada. Sabendo-se que a *C.scolymus* é conhecida por ser diurética (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996) e associando-se os dados relativos ao consumo de ração e ganho de peso, uma hipótese que poderia justificar estes dados (isto é, a queda do ganho de peso e o aumento do consumo de água), seria de que este aumento da taxa de filtração acarretaria na diurese, o que diminuiria a retenção de líquido no organismo e, conseqüentemente, a queda no ganho de peso. De

fato, vários estudos experimentais ou clínicos evidenciam que a diurese promove a diminuição do peso; neste sentido, um estudo conduzido por Auvichayapat et al. (2008), por exemplo, mostrou que a *Camellia sinensis*, popularmente conhecido como chá verde, causou uma grande redução da massa corporal com aumento do consumo hídrico e da diurese em indivíduos obesos, tratados durante 12 semanas com a planta.

Em relação à *C.scolymus*, uma pesquisa realizada por Fianco et al. (2013), mostrou que, ratos tratados com extrato da planta durante 30 dias, obtiveram uma redução de peso corporal, nas doses de 1 e 1,5 mg/kg, inclusive nos animais mantidos com uma dieta hipercalórica. Portanto, a presente pesquisa corrobora os dados de literatura e a possível justificativa do emprego da alcachofra por humanos obesos objetivando a redução de peso corpóreo.

No estudo bioquímico, realizado nas fêmeas gestantes tratadas com o extrato seco de *C.scolymus*, foi notado apenas o aumento da enzima ALT em todos os animais tratados, em relação ao grupo controle. Embora este dado concorde com os achados de Fianco et al. (2013), que observaram aumento de enzimas hepáticas em um tratamento com extrato de *C. scolymus*, em ratos, durante 30 dias, seria extemporâneo, neste momento, sugerir dano hepático. Deve-se considerar que, embora tenha havido aumento significativo nos níveis sanguíneos de ALT nas ratas pertencentes aos três grupos tratados com a planta, a variação desses parâmetros em ratos Wistar é muito grande (CARVALHO et al., 2008), dificultando maiores especulações deste achado. Além disso, é importante considerar que a histopatologia revelou não haver qualquer alteração no parênquima hepático. Seguindo este raciocínio, Campos e Amaral (2009), ponderam que nos estudos de toxicologia, quando há um grande volume de parâmetros biológicos avaliados, é inevitável que alguns não apresentem relevância biológica, ou seja, tais resultados podem ser “falsos positivos”. Portanto, para a correta inferência sobre a toxicidade de uma determinada substância é condição *sine qua non*, associar os resultados dos dados bioquímicos entre si, a avaliação clínica, bem como o detalhado estudo histopatológico, conforme preconizado por Borges (2001).

Assim sendo, embora os dados aqui verificados não corroborem os estudos que atribuem efeito hepatoprotetor à *C.scolymus* (GEBHARDT, 1998), inclusive promovendo diminuição dos níveis das enzimas ALT e AST em ratos intoxicados com o tetracloreto

de carbono (SPERONI et al., 2003), um clássico agente hepatotóxico (OLSON, 2013), não é possível atribuir hepatotoxicidade da alcachofra nas fêmeas gestantes.

No presente estudo, verificou-se que a administração do extrato seco de *C. scolymus* às fêmeas gestantes promoveu a diminuição do peso e comprimento dos fetos, quando comparados ao grupo controle. Ainda, foi possível verificar que aquelas mães tratadas com a maior dose da alcachofra apresentaram menor número de fetos vivos. Por outro lado, não foram observadas alterações esqueléticas ou viscerais, nos fetos dos diferentes grupos avaliados.

Fleeman et al. (2005), claramente evidenciou, em um estudo em ratas gestantes sob restrição alimentar, que a queda de peso em até 50% nestas fêmeas produziu apenas diminuição do peso fetal, mas não houve decréscimo na viabilidade fetal. No presente estudo observou-se não somente a queda no peso, mas também mortalidade fetal de mães dos grupos experimentais, cuja queda no ganho de peso foi de, no máximo, 20% em relação ao grupo de ratas não tratadas com a planta. Uma possibilidade que poderia ser aventada é a de que princípio(s) ativo(s) da alcachofra poderia(m) ter atravessado a placenta, causando injúria no feto. Reforça esta suposição o fato de que as fêmeas que foram tratadas com a *C.scolymus* não apresentaram queda no consumo de alimento, descartando a possibilidade de que tais efeitos estariam relacionados à desnutrição.

Por outro lado, esta constatação de não estar relacionado à desnutrição, permite levantar outra hipótese para estas alterações no feto e estaria relacionada aos efeitos deletérios na placenta de algum composto presente na alcachofra. De fato, muitos estudos vêm apontando que xenobióticos podem alterar a transferência placentária de nutrientes da mãe para o feto; neste sentido, verifica-se que perturbações na circulação materno-fetal podem acarretar lesões na placenta, promovendo alterações neste tecido e, assim, influenciando no desenvolvimento embrionário, podendo ter como consequência até mesmo morte embrionária (JAMES; GOODMAN; HARBISON, 1982; VITRAL et al., 1987). Acorda com esta hipótese um estudo realizado, neste laboratório, no qual foram observadas lesões placentárias na prole de ratas tratadas com suainsonina, princípio ativo tóxico, presente na *Ipomea carnea* (LIPPI, 2009). Assim, futuros estudos histopatológicos deverão ser conduzidos para confirmar ou não se algum princípio ativo da *C.scolymus* teria efeito placentotóxico.

Outra suposição para explicar o atraso de desenvolvimento e a mortalidade fetal seria decorrente de uma potente ação uterotônica, produzido por algum princípio ativo da *C.scolymus* e que acarretaria em um déficit transitório na circulação fetal, causando, assim, retardo no crescimento e morte fetal. De fato, uma pesquisa conduzida por Pastusazk et al. (1997), verificaram que mulheres gestantes que faziam uso de misoprostol, um análogo sintético da prostaglandina e sabidamente uma substância produtora de contração uterina, promoveu uma série de anomalias fetais. Assim sendo, seria plenamente justificada a realização de estudos futuros, que pudessem verificar se há ação de contratura do miométrio promovida pelo extrato da alcachofra.

Concluindo, embora não tenha sido objetivo desta pesquisa a avaliação de efeitos terapêuticos aludidos ao extrato de *C. scolymus* não foram aqui verificados. Por outro lado, foi possível constatar que a despeito da inobservância de qualquer sinal de toxicidade geral em ratos adultos (machos e fêmeas), submetidos ao tratamento prolongado com a *C.scolymus*, bem como nenhum indício de imunotoxicidade, os dados relativos ao estudo da teratogenicidade claramente evidenciaram alterações no conceito, permitindo, portanto, sugerir que fitoterápicos à base da *C.scolymus* não devam ser consumidos por gestantes.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- O estudo químico do extrato seco de *C. scolymus*, empregado nesta pesquisa, mostrou que havia apenas traços de cinaropirina. Verificou-se que a quantidade de cinarina neste extrato encontrava-se numa concentração aproximadamente sete vezes maior que a quantidade mínima indicada pela empresa que comercializa o produto.
- O extrato de *C.scolymus*, administrado por via oral, durante os 28 dias, não promoveu sinais de toxicidade em ratos, machos e fêmeas.
- O tratamento com o extrato seco de *C. scolymus*, durante 28 dias, com as doses aqui empregadas, não produziu efeitos imunotóxicos.
- O tratamento com o extrato seco de *C. scolymus* administrado a ratas prenhes, do 6º ao 19º dia de gestação:
 - promoveu queda da massa corporal, no entanto, estas fêmeas não apresentaram diminuição no consumo de ração.
 - promoveu diminuição do número de fetos vivos, do peso ao nascimento e do comprimento fetal, caracterizando, portanto, o efeito tóxico da *C.scolymus* no feto.
 - não produziu malformações ósseas e/ou viscerais nas proles das ratas tratadas com diferentes doses do extrato de *C.scolymus* durante a gestação.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

ADZET, T.; CAMARASA, J.; LAGUNA, J. C. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCL₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. **Journal of Natural Products**, v. 50, p. 612-617, 1987.

ADAMS, J. Prenatal exposure to teratogenic agents and neurodevelopmental outcome. **Research of Infant Assessment**, v. 25, n. 6, p. 63-72, 1993.

ALEXANDRE, R. F.; GARCIA, F. N.; SIMÕES, C. M. O. Fitoterapia baseada em evidências. Parte 2: medicamentos fitoterápicos elaborados com Alcachofra, Castanha-da-Índia, Ginseng e Maracujá. **Acta Farmacêutica bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 310-314, 2005.

ALONSO, J. **Tratado de fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Ibis, 1998. 1039p.

AUVICHAYAPAT, P.; PRAPOCHANUNG, M.; TUNKAMNERDTHAI, O.; SRIPANIDKULCHAI, B.; AUVICHAYAPAT, N.; THINKHAMROP, B.; KUNHASURA, S.; WONGPRATOOM, S.; SINAWAT, S.; HONGPRAPAS, P. Effectiveness of green tea on weight reduction in obese thais: a randomized, controlled trial. **Physiological Behavior**, v. 93, n.3, p.486-491, 2008.

BALBACH, A. **As hortaliças na medicina doméstica**. 26. ed. São Paulo: Ede, 1991. p.191-198.

BARROS, S. B. M.; SOLANGE, C. M. Avaliação da Toxicidade. In: SEIZA, O. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo, 1996. p. 59 -70.

BELINATI, K. D. **Efeitos do ácido clorogênico sobre funções de neutrófilos: estudos in vitro**. 2010. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.781-788.

BERNHARD, V. H. Quantitative bestimmung der bitter-sesquiterpene von *Cynara scolymus* L. (artichoke) und *Cynara cardunculus* L (kardone) (Compositae). **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 57, n. 7, p. 179-180, 1982.

BLEDSON, G.; SHEN, B.; YAO, Y. Y.; HAGIWARA, M.; MIZELL, B.; TEUTON, M.; GRAN, D.; CHAO, L.; CHAO, J. Role of tissue Kalikrein in prevention and recovery of gentamicin-induced renal injury. **Toxicological Sciences**, Reston, v. 102, n. 2, p. 433-443, 2008.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine - expanded comission and monographs**. Newton: American Botanical Council, 2000.

BORGES, D. R. Exames bioquímicos. In: KALIL, A. N.; COELHO, J.; STRAUSS, E. **Fígado e Vias Biliares**. São Paulo: Revinter, 2001. p. 11-16.

BRANDÃO, A. Novos fitoterápicos na rede pública. **Pharmácia Brasileira**, ano 12, n. 73, 2009.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**. Brasília; DF, 2004a.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina a publicação da “**Lista de registros simplificado de fitoterápicos**”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2004b.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado**. Brasília, DF, 2008.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de normas da COFID**. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Dispões sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Brasília, DF, 2010.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulários de fitoterápicos da farmacopéia brasileira**. Brasília, DF, 2011. p.126.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado**. Brasília, DF, 2014.

BRIGGS, G. G.; FREEMAN, R. K.; YAFFE, S. J. 5. ed **Drugs in pregnancy and lactation**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1998. 1220 p.

BROWN, J. E.; RICE-EVANS, C. Luteolin-Rich Artichoke Extract Protects Low Density Lipoprotein from Oxidation *in vitro*. **Free Radical Research**, v. 29, p. 247–255, 1998.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 297-315.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARLOS, I. Z.; LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C. B. A.; MARQUES, M. F.; JORDÃO-JÚNIOR, C. M.; RINALDO, D.; CALVO, T. R.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill (Malpigiaceae) na resposta imune. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 1, p. 44-50, 2005.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; MAHMUD, N. S.; SHUQAIR, S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T & C Amazônia**, Ano 5, n. 11, 2007.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; MARIOT, A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 371-400.

CARVALHO, G. D.; MASSENO-BATISTA, A. P.; ZANINI, M. S.; PORFÍRIO, L. C.; MACHADO, J. P. e MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, 2008.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p.680-685, 2000.

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**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Algumas considerações sobre a função e importância da fitoquímica de plantas medicinais para obtenção de novos medicamentos. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99-105, 1999.

CHAN, T. Y.; TAM, H. P.; LAI, C. K.; CHAN, A. Y. A multidisciplinary approach to the toxicologic problems associated with the use of herbal medicines. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n. 1, p. 53-57, 2005.

CHANG, W.; CHEN, C.; LEE, M.; CHANG, T.; YU, Y. Chlorogenic acid attenuates adhesion molecules regulation in IL-1 β -treated endothelial cells. **European Journal of Nutrition**, Taiwan, v. 49, p. 267-275, 2009.

CHANG, L. C.; CHAVEZ, D.; SONG, L. L, FARN-SWORTH, N. R, PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, D. Absolute configuration of novel bioactive flavonoids from *Tephrosia purpurea*. **Organic Letters**, n. 4, p. 515-518, 2000.

CHARLES RIVERS LABORATORIES. **Wistar rat biochemistry; North American Colonies**, 2008. Disponível em: <http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_wistar_rat_biochemistry_2009>. Acesso em: junh, 2009

CHENG, C. H. K.; COSTALL, B.; HAMBURGUER, M.; HOSTETTMANN, K.; NAYLOR, R. J.; WANG, Y.; JENNER, P. Toxic effects of solstitialin A13 acetate and cinaropicrin from *Centaurea solstitialis* L (Asteraceae) in cell cultures of foetal rat brain. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 271-277, 1992.

CLIFFORD, M. N. J.; WALKER, R. Chlorogenic acids confounders of coffee-serum cholesterol relationships. **Food Chemical**, v. 24, p. 77-80, 1987.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden absorption and metabolism. **Food Agriculture**, v. 80, p. 1033-1043, 2000.

COICO, R.; SUNSHINE, G.; BENJAMINI, E. **Immunology: a short course**. 5. ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2003. 361p.

COOK, J. A.; HOFFMAN, E. O.; DI LUZIO, N. R. Influence of lead and cadmium on the susceptibility of rats to bacterial challenge. **Experimental Biology and Medicine**, v. 150, n. 3, p. 741-747, 1975.

CÓRDOBA, F.; WIECZOREK, G.; PREUSSING, E.; BIGAUD, M. Modeling of delayed type hypersensitivity (DTH) in the non-human primate (NPH). **Discovery Today: Disease Models**, v. 5, p. 63-71, 2008.

COSTA, R. S.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L.; JÚNIOR, J. O. C. S. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, n. 3, p. 169-174, 2009.

CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia**. Disponível em: <<http://www.antoniopcunha.com.sapo.pt>>. 1999. Acesso em: abr. 2014.

DALLY, A. Thalidomide: was the tragedy preventable? **The Lancet**, v. 351, p.1197-1199, 1998

DAL MORO, A. N.; SILVESTRI, K.; SILVA, R. M. Avaliação clínica de icterícia: correlação com níveis séricos de bilirrubinas. **Revista on-line da Associação Catarinense de Medicina**, v. 33, n. 4, p. 15-22, 2004.

DE JONG, W. H.; VAN LOVEREN, H. Screening of xenobiotics for direct immunotoxicity in an animal study. **Methods**, v. 41, n. 1, p. 3-8, 2007.

DICKE, J. M. Teratology: principles and practice. **Medical Clinics of North America**, v. 73, p. 567-582, 1989.

DONG, G. C.; CHUANG, P. H.; CHANG, K. C.; JAN, P. S.; HWANG, P. I.; WU, H. B.; YI, M.; ZHAU, H. X.; CHEN, H. M. Blocking effect of an immune-suppressive agent, cynarin, on CD28 of T-cell receptor. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 2, 2009.

DOS SANTOS, M. D.; ALMEIDA, M. C.; LOPES, N. P.; DE SOUZA, G. E. P. Evaluation of the anti-inflammatory analgesis and antipyretic activity the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and Pharmaceuthical Bulletin**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 11, p. 2236-2240, 2006.

EMBIRUÇUI, E. K. Risco teratogênico: a percepção em diferentes segmentos da população. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 4, n. 3, p. 201-207, 2005.

ENGLISCH, W.; BECKERS, C.; UNKAUF, M.; RUEPP, M.; ZINSERLING, V. Efficacy of artichoke dry extract in patients with hyperlipoproteinemia. **Arzneim Forsch Drug Research**, v. 50, p. 260–265, 2000.

FANTINI, N.; COLOMBO, G.; GIORI, A. 2010. Evidence of glycemia lowering effect by a *Cynara scolymus* L. extract in normal and obese rats. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 463–466, 2010.

FIANCO, K. C.; FARBEROWOZ, F.; ALLGAYER, M. C.; BRUM, L. F. S. **Avaliação do efeito de *Cynara scolymus* no ganho de peso em ratos submetidos à dieta padrão e hipercalórica.** In: Salão de iniciação científica e tecnologia, Expoulbra, 19, **Anais...** Canoas: Universidade Luterana do Brasil, 2013.

FLEEMAN, T. L.; CAPPON, G. D.; CHAPIN, R. E.; HURT, M. E. Effects of feeding restrution during organogenesis on embryo-fetal development in the rat. **Birth Defects Research**, v. 74, p. 442-449, 2005.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F.; Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Construindo a História dos Produtos Naturais**, 2006. http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm, Acesso em: abr. 2014.

FOX, S. T. **Fisiologia Humana**. 7. ed. Barueri: Manole, 2006. 726p.

FREIRE, S. E.; URTUBEY, E. Compuestas medicinales de la Provincia Biogeografica Pampeana: claves para su daterminación e iconografias- parte I: compuestas espinosas (grupo 1) y compuestas com tallos alados (grupo 2). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.18, n. 3, p.192-199, 1999.

FRITSCHÉ, J.; BEINDORFF, C. M.; DACHTLER, M.; ZHANG, H.; LAMMERS, J. G. Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. **European Food Research Technology**, v. 215, p. 149-157, 2002.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GARCIA-LAFUENTE, A.; GUILLAMIN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTYNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**., v. 58, p. 537-552, 2009.

GEBHARDT, R. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultered rat hepatocytes. **Toxicology applied Pharmacology**, v. 144, n. 2, p. 279-86, 1997.

GEBHARDT, R. Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L) extracts. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapy**, v. 386, n. 3, p. 1122-1128, 1998.

GOETZ, P.; LE JEUNE, R. Artichoke leaf extract for treating hypercholesterolaemia (Review). **Phytotherapie**, v. 5, n. 4, p. 219-222, 2007.

GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p.179-198.

GÓRNIK, S. L.; SPINOSA, H. S. e BERNARDI, M. M. Toxicologia do desenvolvimento. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri: Manole, 2008. p. 701-731.

GOUVEIA, S. C.; CASTILHO, P. C. Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. **Food Research International**, v. 48, p. 712–724, 2012.

HAMMOUDA, F. M.; SEIF EL-NASR, M. M.; SHAHAT, A. A. Flavonoids of *Cynara scolymus* L. cultivated in Egypt. **Plants Foods for Human Nutrition**, v. 44, n. 2, p.163-169, 1993.

HAN, E. H.; KIM, J. Y.; KIM, H. G.; CHUND, H. K.; CHUNG, Y. C.; JEONG, H. G. Inhibitory effect of 3-caffeoyl-4-dicaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* against phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages. **Chemical Biological Interactions**, v. 183, n. 3, p. 397-404, 2010.

HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. L. Introdução ao estudo das plantas tóxicas. In: SPINOSA, H.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri: Manole, 2008. p.367-414.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n.1, p. 53-58, 1989.

HEIDARIAN, E.; SOOFINIYA, Y.; HAJIHOSEINI, R. The effect of aerial part of *Cynara scolymus* extract on the hyperlipidemia, plasma antioxidant capacity and superoxide dismutase activity in diabetic rats. **Journal of Shahrekord University of Medical Sciences**, v. 13, n. 5, p. 1-10, 2011.

HEIL, B. M. Standortbestimmung zum Artischocken extrakt. **Zeitschrift für Phytotherapie**, v. 16, n.78, p. 11-12,1995.

HECKERS, H.; DITTMAR, K.; SCHMAHL, F. W.; HUTH, K. Inefficiency of cynarin as therapeutic regimen in familial type II hyperlipoproteinaemia. **Atherosclerosis**, v. 26, n. 2, p. 249-253, 1977.

HORSFALL, L. J.; RAIT, G.; WALTERS, K.; SWALLOW, D. M.; PEREIRA, S. P.; NAZARETH, T.; PETERSEN, I. Serum bilirubin and risk of respiratory disease and death. **Jama**, v. 307, n. 7, p. 691-697, 2011.

HUEZA, I. M.; PALERMO-NETO, J. Imunotoxicologia. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. 942p.

HUEZA, I. M.; GUERRA, J.; HARAGUCHI, M.; GARDNER, D.; ASANO, N.; IKEDA, K.; GÓRNIK, S. L. Assessment of the perinatal effects of maternal ingestion of *Ipomea carnea* in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 58, p. 439-446, 2007.

JANEWAY-JR, C. A.; TRAVERS, P. **Imunobiologia**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 634p.

JAMES, R. C.; GOODMAN, D. R.; HARBISON, R. D. Placental Toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 123-128, 1982.

JIMENEZ-ESCRIG, A.; DRAGSTED, L. O.; DANESHVAR, B.; KRAFT, K. Artichoke leaf extract recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. **Phytomedicine**, v. 4, p. 369–378, 1997.

JOHNSON, S. E. Afecções do fígado. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. Barueri: Manole, v. 2, 1997. p.1817-1877.

JOY, J. F.; HABER, S. L. Clinical uses of artichoke leaf extract. **American Journal of Health System Pharmacy**, v. 64, p.1904-1909, 2007.

JUCHAU, M. P. Bioactivation in chemical teratogenesis. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, v. 29, p.165-187, 1989.

JURADO, R.; MATTIX, H. The Decreased Serum Urea – Nitrogen-Creatine Ratio. **Archives of Internal Medicine**, v.158, n. 22, p. 2509-2511, 1998.

KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21th century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 153-148, 2001.

KOBAYASHI, K.; KANEDA, K.; KASAMA, T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, n. 4, p. 241-245, 2001.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Mechanism of teratogenesis: electron transfer, reactive oxygen species and antioxidants. **Birth Defects Research Part**, n. 78, p. 308-325, 2008.

KRAFT, T. Artichoke leaf extract recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. **Phytomedicine**, v. 4, p. 369-378, 1997.

KUSKU-KIRAZ, Z.; MEHMETÇIK, G.; DOGUI-ABBASOGLU, S.; UYSAL, M. Artichoke leaf extract reduces oxidative stress and lipoprotein dyshomeostasis in rats fed on high cholesterol diet. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 4, p. 565-570, 2010.

LANGMAN, J. J.; KAPUR, B. M. Toxicology: then and now. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 498-510, 2006.

LEAL, L. K. A. M.; FONTENELE, J. B.; SILVEIRA, E. R.; RIBEIRO, R. A.; Viana, G. S. B. **Efeito do extrato hidroalcoólico da cumarina e da fração de flavonóides de *Amburana cearensis* (Cumaru) sobre a migração de neutrófilos e a permeabilidade vascular em ratos**. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS, Águas de Lindóia, 1998. **Anais....** Águas de Lindóia, 1998.

LEE, T. P.; CHANG, K. J. Health effects of polychlorinated biphenyls. In: DEAN, J. H.; LUSTER, M. I.; MUNSON, A. E.; AMOS, H. **Immunotoxicology and Immunopharmacology**. New York: Raven Press 1985. p.415-422.

LEMONICA, I. P. Toxicologia da reprodução. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. Ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 59-71.

LEWIS, J. G.; ADAMS, D. O. The mononuclear phagocyte system and its interaction with xenobiotics. In: **Immunotoxicology and Immunopharmacology**, In: DEAN, J. H.; LUSTER, M. I.; MUNSON, A. E.; AMOS, H. Raven Press: New York, 1985. p. 23-44.

LIPPI, L. L. **Estudo da toxicidade da *Ipomea cárnea* em ratas durante o período perinatal. Avaliação dos possíveis efeitos lesivos no tecido placentário**. Dissertação

(Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LUSTER, M. I.; MUNSON, A. E.; THOMAS, P. T.; HOLSAPPLE, M. P.; FENTERS, J. D.; WHITE, K. L.; LAUER, L. D.; GERMOLÉ, D. R.; ROSENTHAL, G. J.; DEAN, J. H. L. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Programs Guidelines for Immunotoxicity evaluation in mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 2-19, 1988.

MACLACHLAN, N. J.; CULLEN, J. M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. E. **Patologia veterinária especial de Thomson**. Porto Alegre,: Art Med, 1998. 739p.

MARRASSINI, C.; ACEVEDO, C.; MINO, S.; GORZALCZANY, S. Evaluation of antinociceptive, antiinflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 12, p. 1807-1812, 2010.

MCELHATTON, P. R. Principles of teratogenicity. **Current Obstetrics Gynaecology**, v. 9, p.163-169, 1999.

MARTELLONI, L. **Effetto della micorrizazione sul contenuto in fenoli e sul potere antiossidante di piante di carciofo (*Cynara scolymus* L.)**. 2005. 69p. Tesi (Corso di laurea specialistica in Biotecnologie Alimentari). Agraria Facoltà, Università di Pisa, Pisa, 2005.

MELLO F. B. **Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. Porto Alegre, 120p. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2001.

MELLO, J. R. B.; MELLO, F. B.; LANGELOH, A. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Gentiana lutea*, *Rheum palmatum*, *Aloe ferox*, *Cynara scolymus*, *Atropa belladonna*, *Peumus boldus* e *Baccharis trimera* em Coelhos Nova Zelândia. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 752-756, 2008.

MENDES, F. T. Fígado e drogas. In: DANI, R.; CASTRO, L.P. **Gastroenterologia clínica**. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p.1035-1042.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. Ribeirão Preto: Tecmedd. 2004. p.11-18.

MILEO, A. M.; VENERE, D. D.; LINSALATA, V.; FRAIOLI, R.; MICCADEI, S. Artichoke polyphenols induce apoptosis and decrease the invasive potencial of the human breast câncer cell line MDA-MB231. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, p. 3301-3309, 2012.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M.G. **Embriologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 311-330.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 4. ed. São Paulo: Robe Editorial, 2003. p.241-260.

MOREIRA, L. M. A.; DIAS, A. L.; RIBEIRO, H. B. S.; FALCÃO, C. L.; FELÍCIO, T. D.; STRINGUETTI, C. Associação entre o uso de abortifacientes e defeitos congênitos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 8, p. 517-521, 2001.

MOSHI, M. J.; LUTALE, J. J. K.; RIMOY, G. H.; ABBAS, Z. G.; JOSIAH, R. M.; ANDREW, B. M. The effect of *Phyllanthusamarus* aqueous extract on blood glucose in non-insulin dependent diabetic paatients. **Phytotherapy Research**, Malden, v. 15, n. 7, p. 577-580, nov. 2001.

NASSAR, M. I.; MOHAMED, T. K.; ELSHAMY, A. I.; EL-TOUBRY, S. A.; LATEEF, A. M. A.; FARRAG, A. R. H. Chemical constituents and anti-ulcerogenic potencial of the scales of *Cynara scolymus* (artichoke) heads. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 93, p. 2494-2501, 2013.

NEUMANN, A. **Alcachofra: sob o ponto de vista antropofósico**. 2000. Disponível em: <<http://www.canalvip.com.br/neumart/pm/cynacol11.htm>. Acesso em: mar. 2014.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, D. J. **Herbal medicines: a guide for health-care professionals**. Londres: The Pharmaceutical Press. 1996. p. 36-37.

NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

NüßLEIN, H. G.; HUPPERTZ, H. I.; MASSENKEIL, G.; MENGEL, E. Splenomegaly: an important cardinal symptomatoren. **Aktuelle Rheumatologie**, v. 34, n. 4, p. 213-219, 2009.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guiderline for the testing of chemicals 407**. Paris: OECD, 1995.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guiderline for the testing of chemicals 414**. Paris: OECD, 1995.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **The validation of test methods considered for adoption as OECD test guidelines**. Paris OECD, 1998.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guiderline for Acute oral toxicity 425**. Paris: OECD, 1999.

OLSON, K. R. **Manual de Toxicologia Veterinária Clínica**. 6. Ed, New York: McGraw-Hill, 2013. p.384-385.

PARHAM, P. **O sistema imune**. São Paulo: Artmed, 2001. 372p.

PASTUSAZK, A. L. Misoprostol use during pregnancy is associated with increased risk for Mobius sequence. **Teratology - The Journal of Abnormal Development**. New York : Wiley-Liss, 1997. p. 36-38.

PEARSON, E.G. Moléstias do sistema hepatobiliar. In: SMITH, B. S. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. Barueri: Manole, 1993. p. 839-872.

PERAZELLA, M. A. Renal vulnerability to drug toxicity. **Clinical Journal of American Society of Nephrology**, n. 4, v. 7, p.1275-1283, 2009.

PEREIRA, C.; CALHELHA, R. C.; BARROSA, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidant properties, anti-hepatocellular carcinoma activity and hepatotoxicity of artichoke, milk thistle and borututu. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 61-65, 2013.

PIETTA, G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.7, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, A. C.; REGO, G. C. G.; SIQUEIRA, A. M.; CARDOSO, C. C.; REIS, P. A.; MARQUES, E. A.; COELHO, M. G. P.; SABINO, K. C. C. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 435-439, 2007.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 45-61, 2002.

PRADO, C. F.; RAMOS, J.; VALLE, R. J.; CARVALHO, T. B. **Atualização terapêutica**, 23. ed., São Paulo: Artes Médicas, 2007. p. 33-43.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

RAHALISON, L.; HAMBURGUER, M.; HOSTETTMANN, K.; MONOD, M.; FRENK, E. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 5, p. 199-203, 1991.

RASOOL, M., VARALAKSHMI, P. Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: An *in vivo* and *in vitro* study. **Vascular Pharmacology**, v. 44, p. 406-410, 2006.

RAZA, M.; AL-SHABANAH A. O; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Sciences Pharmaceutical**, v. 70, p.135-145, 2002.

RENISUS. Relação Nacional de Plantas Medicinais do Interesse ao Sistema Único de Saúde. **MS elabora relação de plantas medicinais de interesse ao SUS**, 2009. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf. Acesso em: fev. 2014.

RIBEIRO, C. A. F. Justifica-se o uso de extratos de plantas medicinais na terapêutica da ansiedade e da depressão? **Revista Saúde Mental**, v. 2, n. 4, p. 9-14, 2000.

RODRIGUES, H. G.; MEIRELES, C. G.; LIMA, J. T. S.; TOLEDO, G. P.; CARDOSO, J. L.; GOMES. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n.3. p.359-366, 2011.

ROGERS, J. F.; KAVLOCK, R. J. Developmental toxicology. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: Mc Graw-Hill, 2001. 281p.

ROGERS, J. F.; THOMPSON, S. J.; ADDY, C. L.; MCKEOWN, R. E.; COWEN, D. J.; DECOUFLE, P. Association of very low birth weight with exposures to environmental sulfur dioxide and total suspended particulates. **American Journal of Epidemiology**, v. 151, p. 602-613, 2000.

RONDANELLI, M.; GIACOSA, A.; ORSINI, F.; OPIZZI, A.; VILLANI, S. Appetite control and glycaemia reduction in overweight subjects treated with a combination of two highly

standardized extracts from *Phaseolus vulgaris* and *Cynara scolymus*. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 11-15, 2011.

RUNJAIC-ANTIC, D.; PAVKOV, J.; LEVIC, L. Herbs in a Sustainable animal nutrition. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 26, p. 203-214, 2010.

SAHA, K.; KAUR, P.; SRIVASTAVA, G.; CHAUDHURY, D.S. A six-months follow up study of growth, morbidity and functional immunity in low birth weight neonats with special reference in intrauterine growth retardation in small-for-gestacional-age infants. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 29, p. 278-282, 1983.

SAKER, K. E. Nutrition and immune function. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 36, n. 6, p.1199-1224, 2006.

SANTOS, M. R. V.; SOUZA, V. H.; MENEZES, I. A. C.; BITENCURT, J. L.; REZENDE-NETO, J. M.; BARRETO A. S.; CUNHA, F. A.; MARÇAL, R. M.; TEIXEIRA-SILVA, F.; QUÍNTANS-JÚNIOR, L. J.; BARBOSA, A. P. O. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 6, n. 10, 2010.

SCHARDEIN, J. L. Principles of teratogenesis applicable to drug and chemical exposure. In: _____. **Chemically induced birth defects**, New York: Marcel Dekker, 2000. p. 1-67.

SCHNEIDER, V. G.; THIELE, K. Die Verteilung des bitterstoffis cynaropicrin in der artichoke. **Planta Médica**, v. 26, p. 174-183, 1974.

SHARMA, K. K.; MEDIRATTA, P. K.; REETA, K. H.; MAHAJAN, P. Effect of repeated locoweed feeding on peripheral lymphocytic function and plasma protein in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 2090-2093, 1984.

SHARON, A.; CENTER, D. M. V. Avaliação bioquímica da função hepática no cão e no gato. **Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais**, 1995. p.1166-1183.

SHEN, Q.; DAI, Z.; LU, YANBIN. Rapid determination of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. by ultrafast liquid chromatography/tandem mass spectrometry based on a fused core C18 column. **Journal of Separition Science**, v. 33, p. 3152–3158, 2010.

SHEPARD, T. H. **A catalog of teratogenic agents**, 8. ed. Baltimore: Johns Hopkins Press, 1995. 510p.

SHARP, P. E.; LAREGINA, M. C. **The laboratory rat**. Flórida: CRC Press, 1998. 204p.

SCHULER-FACCCINI, L.; LEITE J. C. L.; SANSEVERINO, M. T. V.; PERES, R. M. Evaluation of potential teratogens in brazilians population. **Ciência e Saúde Coletiva**, n. 7, v. 1, p. 65-71, 2002.

SIANI, A. C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica**. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003. 97p.

SILVEIRA, J. M. **Patologia clínica veterinária: Teoria e Interpretação**. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 87-95, 1988. 566p.

SIMÕES, C. M. O. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 5ª. ed. Porto Alegre: UFRGS. p. 9-18, 1998. 174p.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 1999. p. 442-445.

SMITHELLS, R. W. The challenges of teratology. **Teratology**, v. 22, p. 77-85, 1980.

SONNE, L.; RAYMUNDO, L.; BOABAI, F. M.; WATANABE, T. T. N.; OLIVEIRA, L. G. S.; OLIVEIRA, I. S. V.; DRIEMEIER, D. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em bovinos com doença granulomatosa sistêmica pelo consumo de *Vicia Villosa* no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 307-312, 2011.

SPERONI, E.; CERVELLATI, R.; GOVONI, P.; GUIZZARDI, S.; RENZULLI, C.; GUERRA, M. C. Efficacy of diffent *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 203-211, 2003.

STAPLES, R. E.; ACHENELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in KOH-alizarin method for fetal bone. **Stain Technology**, v. 39, p. 61-63, 1964.

STEVENS, K. R.; GALLO, M. Pratical considerations in the conduct chronic toxicity studies. In: HAYES, A. W. (Ed). **Principles and methods of toxicology**, New York: Raven Press, 1989. p. 237-250.

SUTTIE, A. W. Histopathology of the spleen. **Toxicology Pathology**, v. 34, n. 5, p. 466-503, 2006.

TAYLOR, P. Skeletal examination. In: TAYLOR, O. **Practical teratology**. London: Academic Press, 1986. p. 77-100.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90 day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183-196, 2002.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Compêndio de fitoterapia**. 2. ed. Curitiba: Herbarium, 1995. p.10-15.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia** 4. ed. Curitiba: Herbário Laboratório Botânico, 2001. 317p.

THOMPSON COON, J. S.; HERNST, E. Herbs for serum cholesterol reduction: a systematic view. **Journal of the Family Practice**, v. 52, p. 468–478, 2003.

TIZARD, I. **Introdução à Imunologia Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1985. 545p.

TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 33, p. 360-366, 1999.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 189-306, 2006.

VALLI, V. E. O.; The hematopoietic system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**, San Diego: Academic Press, 1993. 653p.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-28, 2005.

VITRAL, G. S. F.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Mecanismos da ação embriótóxica do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* M.). **Reprodução e Climatério**, v. 3, p. 222-226, 1987.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

WANG, Y.; HAMBURGUER, M.; CHENG, C. H. K.; COSTALL, B.; NAYLOR, R. J.; JENNER, P.; HOSTETTMANN, K. Neurotoxic sesquiterpenoids from the yellow star thistle *Centaurea solstitialis* L. (Asteraceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 74, p. 117-123, 1991.

WEBSTER, W. S. Teratogen update: congenital rubella. **Teratology**, v. 58, p.13-23, 1998.

WEIER, K.M.; BEAL, M. Complementary therapies as adjuncts in the treatment of postpartum depression. **Journal of Midwifery Women's Health**. vol. 49, n. 2, p. 96-104, 2004.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Principles of the testing of drugs for teratogenicity**. World Health Organization, Technical Report, v. 364, p. 5-18, 1967.

WILSON, J. Current status of teratology: general principles and mechanisms derived from animal studies. In: WILSON, J.; FRASER, F. C. **Handbook of teratology: general principles and etiology**. Nova York : Plenum Press, 1977. p. 47-74.

WILSON, J. C. Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animal. In: WILSON, J. C.; WARKANY, J. **Teratology: principles and techniques**. Chicago: University of Chicago Press, 1965. p. 262-327.

XU, C., DING, G., FU, J., MENG, J., ZHANG, R., LOU, X. Immunoregulatory effects of ethyl-acetate fraction of extracts from *tetrastigma hemsleyanum* diels et. Ggilg on immune functions of ICR mice. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, p. 325-331, 2008.

ZAPOLSKA-DOWNAR, D.; ZAPLOSKA-DOWNAR, A.; NARUSZEWICZ, M.; SIENNICKA, A.; KRASNODEBSKA, B.; KOLODZIEJ, B. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. **Life Sciences**, v. 71, p. 2897-2908, 2002.

ZHANG, Y.; LI, N.; YANG, J.; ZHANG, T. e YANG, Z. Effects of maternal food restriction on physical growth and neurobehavior in newborn Wistar rats. **Brain Research Bulletin**, v. 83, p. 1-8, 2010.

ZHAU, Z.; SHIN, H. S.; SATSU, H. TOTSUKA, M.; SHIMIZU, M. 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress and TNF- α induced secretion of interleukin-8 from caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3863-3868, 2008.

ANEXOS

Anexo 1 – Laudo técnico e identificativo do extrato de *C.scolymus* utilizado nesse trabalho

ANEXO I

Controle de Qualidade

Laudo Técnico e Identificativo

Santosflora
ERVAS, ESPECIARIAS E
EXTRATOS SECOS

Santosflora Comércio de Ervas Ltda.
Rua Tuiuti, 718/720 - CEP 03081-015
São Paulo - SP - Brasil - Fone: +55 11 2091-8787 - Fax: +55 11 2091-6387

E-mail: santosflora@santosflora.com.br
www.santosflora.com.br

Registro IBAMA: 35857
Registro M.S.: 1.04.604-1
SUDS: 6.02.671-1
Ag. Vg. Sanitária: 155030801-109-000092
Data: 27/5/2011

NOMENCLATURA: ALCACHOFRA EXT. SECO 0,5%

Nome científico (gênero/espécie): <i>Cynara scolymus</i> L.		
Identificação botânica: <i>Cynara scolymus</i> L.	Família: Asteraceae	
Parte utilizada: Folha	Origem: Brasil	
Manufatura/Val (mês/ano): 07/2011 - 07/2013	Lote: ALCX01/0711	
Método de secagem: SPRAY DRYER	Excipiente: Amido	

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Aspecto	Pó fino e higroscópico/Elem. Estr.	Pó fino e higroscópico/Ausente
Cor	Pardo ao castanho	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Sabor	Característico	De acordo
Umidade	Máximo 6,0%	5,4%
Densidade Aparente	Entre 0,300 - 0,850 g/ml	0,558g/mL
Doseamento / Identificação	Cinarina (esp. mín. 0,5%)	0,5%
PH (sol. 10%)	5,0 +/- 2,0	3,38
Solubidade	Insolúvel em água	De acordo
Cinzas Totais	Máx. 10,0%	3,85%

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem padrão em placas	Máx. 10.000 UFC/g	10 UFC/g
Bolores e leveduras	Máx. 1.000 UFC/g	10 UFC/g
Contagem de enterobactérias	Ausência/g	Ausente/g
E. coli	Ausência/10g	Ausente/10g
Staphylococcus aureus	Ausência/g	Ausente/g
Pseudomonas sp	Ausência/g	Ausente/g
Salmonella sp	Ausência/10g	Ausente/ 10 g

Observações:

- * Armazenamento em local seco e ventilado, sem umidade e calor;
- * Mudança de cor pode ocorrer devido ao fato de que o produto é de origem natural ou vegetal;
- * Não são somos responsáveis quando os produtos são manipulados e / ou utilizado de forma contrária aos padrões.
- * Exatidão complementar, como microbiologia, podem ser realizadas com custos adicionais.
- * NR refere-se a análise não realizada.
- * A validade será desconsiderada caso o produto seja manipulado ou armazenado em locais inadequados.
- * Esterilização sob consulta.

DCR-04024 L-30090706

Receituário

Análise de: var. Serrada/Cinza Cinza: Ácido Clorogênico/Quantizado - Microbiologia: Ausente

pt-Kendall: Antojas/148

Melhoria: Eduardo Fernandes/Brasília, DF

Fernanda Baffa
FARMACÊUTICA RESPONSÁVEL
CRF/SP: 37.983

Fonte: (SANTOS FLORA, 2012).