

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA**

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO ALCALOIDE BOLDINA EM RATAS
WISTAR DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL SOBRE VARIÁVEIS
REPRODUTIVAS E COMPORTAMENTAIS**

LAIS HARTMANN JARDIM

PORTO ALEGRE/RS

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA**

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO ALCALOIDE BOLDINA EM RATAS
WISTAR DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL SOBRE VARIÁVEIS
REPRODUTIVAS E COMPORTAMENTAIS**

Autora: Lais Hartmann Jardim

**Dissertação de curso de pós-graduação
apresentado ao Instituto de Ciências
Básicas da Saúde da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas:
Farmacologia e Terapêutica**

**Orientador: Prof. Dr. João Roberto
Braga de Mello**

PORTO ALEGRE/RS

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Jardim, Lais
Avaliação da Administração do Alcaloide Boldina em
Ratas Wistar durante o Período Gestacional sobre
Variáveis Reprodutivas e Comportamentais / Lais
Jardim. -- 2017.
88 f.
Orientador: João Roberto de Mello.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre,
BR-RS, 2017.

1. Toxicidade Reprodutiva. 2. Boldine. 3.
Comportamento. 4. Desenvolvimento de Filhotes. 5.
Fitoterápicos. I. de Mello, João Roberto, orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

Em especial, meu agradecimento ao meu professor orientador Dr. João Roberto Braga de Mello, pela paciência, confiança, me orientando durante o crescimento acadêmico desde a graduação. Sou inteiramente grata por essa orientação. Obrigada pelo exemplo!

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para que os experimentos corresse da melhor forma possível, em especial a Amanda. Jamais esquecerei o quanto me ajudastes nesse período. Obrigada pela parceria sempre!

Às doutoras Andrea e Luciana pelos ensinamentos desde a graduação que eu pude pôr em prática durante o mestrado e por todo auxílio sempre que necessário. Muito obrigada!

Aos estagiários que contribuíram ao trabalho: Priscila, Rafaela, Lucas e Muriel que se tornaram alunos e amigos que vou guardar para sempre! Muito obrigada, vocês são especiais!

Ao Setor de Patologia Veterinária, UFRGS (Raquel Sales, Prof. David Driemeier) pela grande colaboração neste trabalho. Muito obrigada!

Aos professores e colaboradores do PPGFT pela dedicação, competência e ensinamentos. Em especial a professora Mirma pelo empréstimo de aparatos essenciais e a secretária Ieda por toda gentileza e carinho quando necessário. Muito obrigada!

Às técnicas Cristiane e Silvia que ajudaram muito na parte experimental das imunohistoquímicas! Muito obrigada!

A minha família por todo apoio, incentivo e auxílio e por sempre me encorajar a buscar novos objetivos como pesquisadora e crescer profissionalmente apoiando minhas decisões, além de o suporte financeiro e emocional durante esse período! Muito obrigada!

Às minhas amigas Juliana, Laura, Nathália, Thayssa e Vanessa por todo apoio emocional que sempre me trazem nas horas de desespero. Em especial a Laura pela ajuda na estatística do trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A boldina é o principal alcaloide encontrado no *Peumus boldus*, muito utilizado na medicina tradicional principalmente pelos seus efeitos gastrointestinais e hepáticos. Estudos indicam que apresenta diversas atividades farmacológicas como coletérica, hipnótica, citoprotetora, antitumoral, anti-inflamatória, antipirética, antiplaquetária, antiplasmódica, antidiabética, anti-hipertensiva, inibidora da tirosinase e da acetilcolinesterase, antagonista dopaminérgico (receptores D1 e D2 *like*), adrenérgico (receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$) e serotoninérgico (receptores 5-HT₃), entre outras. O chá de boldo (*Peumus boldus*) é muito utilizado por gestantes para aliviar os efeitos negativos da gestação como, constipação, cólicas uterinas, cefaleia e náuseas; controverso a esse uso ele também é muito utilizado como abortivo. Este estudo procurou identificar qual sua ação em ratas *Wistar* tratadas durante o período gestacional, GD1 ao dia anterior ao parto, nas doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg, uma vez ao dia, no ciclo claro, por meio gavagem. Conclui-se que o uso da boldina e do chá de *P. boldus* deve ser evitado durante o período gestacional pois seu uso na gestação causou alterações no desempenho reprodutiva das fêmeas, perda pré e pós implantação e mortes ao nascimento e pós-natais, além da modificação do comportamento materno (latência para lambar); foram encontradas também alterações no desenvolvimento da proles de fêmeas tratadas com boldina, em seu desempenho nos testes de reflexos (teste de endireitamento, geotaxia e agarrar), físico (abertura de olhos) e reprodutivo (abertura vaginal, descida de testículos e separação prepucial), assim como alteração no peso de órgãos de machos e fêmeas, na produção de espermatozoides e no percentual de espermatozoides com alteração (anormais).

Palavras-chave: toxicidade reprodutiva, boldine, *Peumus boldus*, desenvolvimento filhotes, toxicidade, substâncias abortivas, fitoterápicos

ABSTRACT

Boldine is the main alkaloid found in *Peumus boldus*, widely used in traditional medicine mainly for its gastrointestinal and hepatic effects. Studies indicate that it presents several pharmacological activities as a choleric, hypnotic, cytoprotective, anti-inflammatory, anti-plasmodic, antipyretic, antiplatelet, antidiabetic, antihypertensive, tyrosinase and acetylcholinesterase inhibitor, dopaminergic antagonist (D1 and D2 like receptors), α -adrenergic receptors antagonist (α 1 and α 2 receptors) and serotonergic receptors antagonist (5-HT 3 receptors), among others. Boldo's tea (*Peumus boldus*) is widely used by pregnant women to alleviate the negative effects of pregnancy such as constipation, uterine cramps, headache and nausea; Controversely it is also widely used as an abortive substance The aim of this study was to identify the effect of boldine on Wistar rats treated during the gestational period, day 1 of gestation to the day before birth, at doses of 1mg/kg, 10mg/kg and 100mg/kg, daily, light cycle, by gavage. We concluded that the use of boldine and *P. boldus* tea should be avoided during the gestational period because its use in the gestacional period caused alterations in the reproductive performance of females, loss of pre and post implantation and deaths at birth and postnatal, besides modification of maternal behavior (latence to pup licking); alterations in the development of the offspring which the females were treated with boldine were observed, in their performance in the reflex tests (straightening, geotaxy and grab), physical development (eye opening) and reproductive development (vaginal opening, testicle descent and preputial separation), as well as changes in the weight of male and female organs, in the production of spermatozoa and in the percentage of abnormal spermatozoa.

Keywords: reproductive toxicity, boldine, *Peumus boldus*, offspring development, toxicity, abortive substances, herbal remedies, fitoterapics.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1. Períodos de desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato.....31

ARTIGO 1

- Figura 1. Evolução da massa corporal (g) da progênie exposta a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação. Dados expressos em média (n=20).
.....44

- Figura 2. Característica de desenvolvimento comportamental (Endireitamento em Superfície) (segundos) da progênie exposta a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação, nos dias pós-natal 2, 3, 4 e 5.....46

- Figura 3. Característica de desenvolvimento comportamental (Geotaxia Negativa) (segundos) da progênie exposta a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação, nos dias pós-natal 7, 8, 9 e 10.....47

- Figura 4. Característica de desenvolvimento comportamental (Resposta de Agarrar) (segundos) da progênie exposta a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação nos dias pós-natal 14, 15, 16 e 17.....48

ARTIGO 2

- Figura 1. Consumo de ração (A) e água (B) de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação no período gestacional. Os dados são média ± EPM. *P* > 0,05 (ANOVA)63

- Figura 2. Consumo de ração (**A**) e água (**B**) de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação no período lactacional. Os dados são média ± EPM. $P > 0,05$ (ANOVA)64
- Figura 3. Evolução da massa corporal gestacional de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação. Dados expressos em média ± EPM (n= 20). Teste Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas ($P > 0,05$).....65
- Figura 4. Evolução da massa corporal lactacional de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação. Dados expressos em média ± EPM (n= 20). Teste Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas ($P > 0,05$)65
- Figura 5. Latência para os comportamentos relacionados ao comportamento materno (comportamento de amamentar (**A**), comportamento de busca dos filhotes (**B**) comportamento de lambar (**C**), construção do ninho (**D**). O valor máximo de 480 segundos como tempo máximo para carregar os filhotes foi utilizado, sendo considerado após isso comportamento não realizado) de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação.....67
- Figura 6. Tempo gasto no comportamento de amamentação dos filhotes (**A**), tempo gasto no comportamento de busca dos filhotes (**B**), tempo gasto no comportamento de lambar os filhotes (**C**) e tempo gasto na construção do ninho (**D**) de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação.....68

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Tabela adaptada de Infarma, 2007, relação das 10 plantas mais utilizadas como emenagogas/abortivas por pacientes do SUS no Brasil por Mengue et al., 1997.....26

ARTIGO 1

Tabela 1. Tempo médio (dias) para o aparecimento das características de desenvolvimento geral e sexual da progênie exposta a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação.....45

Tabela 2. Comportamento em campo aberto de machos cujas progenitoras foram expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação.....48

Tabela 3. Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos púberes expostos a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação.....49

Tabela 4. Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas púberes expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação.....50

Tabela 5. Índices de fertilidade dos machos púberes expostos a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação.....51

ARTIGO 2

- Tabela 1. Desempenho reprodutivo de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação.....62
- Tabela 2. Frequência de entrada no centro, frequência de entrada na periferia, permanência sobre as duas patas traseiras (*rearing*), frequência de locomoção, tempo de imobilidade, autolimpeza (*grooming*) e quantidade de bolos fecais no campo aberto de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação, sendo o teste realizado no GD15 (15º dia gestacional).....66
- Tabela 3. Peso relativo dos órgãos de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação.....69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Boldo (<i>Peumus boldus</i>)	16
3.2	Boldina	17
3.2.1	Farmacocinética do boldina	18
3.2.2	Atividade farmacológicas do boldina	19
3.2.3	Toxicidade do boldina	24
3.2.4	Uso do boldina no período gestacional	26
3.3	Avaliação toxicológica	28
3.3.1	Testes sobre toxicidade reprodutiva	28
3.3.2	Desenvolvimento dos filhotes	30
3.3.3	Comportamento materno e suas vias	33
4	METODOLOGIA E RESULTADOS	38
4.1	ARTIGO 1 – BOLDINE ADMINISTRADO DURANTE A GESTAÇÃO ALTERA O DESENVOLVIMENTO DA PROLE	38
4.2	ARTIGO 2 – BOLDINE ALTERA DESEMPENHO REPRODUTIVO DE RATAS WISTAR	58
5	CONCLUSÕES	76
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm se mostrado uma excelente fonte de busca para novos fármacos, incluindo substâncias antioxidantes, antipsicóticas, quimioterápicas, antimicrobianas, entre outras. Conseqüentemente a busca por novas substâncias naturais que sejam biologicamente ativas é muito grande e cientistas procuram por plantas com potencial terapêutico em diferentes regiões do planeta (HUSSAIN *et al.*, 2011). As plantas são muito úteis na pesquisa farmacêutica para a síntese e produção de fármacos, aumentando as opções terapêuticas tanto para o tratamento quanto para terapia complementar (DANTAS, 2016).

O uso de plantas medicinais, no Brasil, é vastamente difundido e a maior parte dos fitoterápicos comercializados é vendida sem prescrição médica. Pouco é informado aos profissionais da área da saúde pela população sobre a utilização destes recursos (INFARMA, 2007). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que o uso de plantas medicinais tem grande importância, sugerindo ser uma alternativa viável e importante às populações dos países em desenvolvimento, já que seu custo é diminuído e conclui que, no mundo, 80% das pessoas dependem da medicina tradicional para suas necessidades de cuidados primários de saúde (WHO, 2005).

Apesar de seu vasto uso na medicina tradicional, poucas são as plantas medicinais estudadas segundo os atuais protocolos emitidos por órgãos científicos internacionais (CAPASSO *et al.*, 2000; VEIGA JUNIOR, 2008).

Um dos principais problemas da utilização destes produtos é a crença de que produtos de origem vegetal são isentos de reações adversas e de efeitos tóxicos. Por muitos motivos, a atenção dirigida pelas autoridades e órgãos gestores em saúde, em diferentes setores, para o uso de plantas medicinais aumentou consideravelmente nos últimos anos. Para que produtos industrializados (fitoterápicos e fármacos em geral) sejam produzidos ou disponibilizados no mercado para consumo, a legislação brasileira e internacional exige uma avaliação rigorosa de suas características que inclui testes para determinar suas atividades toxicológicas e ainda seu potencial mutagênico.

Existem diferenças entre as exigências nos diferentes países ou blocos econômicos, mas em geral, os principais protocolos a serem observados são os emitidos pela Europa através da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), pelos Estados Unidos da América através do *Food and Drug Administration* (FDA) (SILVA *et al.*, 2003). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão regulador para registro de medicamentos fitoterápicos para uso humano e prevê a realização de estudos de toxicidade pré-clínica. Os ensaios de toxicidade reprodutiva estão previstos quando o medicamento for indicado para administração de longa duração ou para gestantes, segundo o guia emitido por esse órgão que tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica para fitoterápicos incluindo toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas e ensaios de genotoxicidade e toxicidade tóxica (ANVISA, 2004). Esta regulamentação é muito importante já que a busca por fitoterápicos é grande por mulheres em períodos gestacionais para tratar sintomas decorrentes da gestação, por acreditarem que plantas medicinais não causam prejuízo ao feto ou ao bebê. Entretanto, muitas substâncias de origem vegetal se mostraram potencialmente embriogênicas ou teratogênicas em experimentos em animais (CAMPESATO, 2005).

Os estudos mais utilizados para estas avaliações são divididos em três segmentos, adaptando-se as normas da ANVISA com as normas internacionais guiadas pela *Environmental Protection Agency* (EPA) e recomendada pela OECD e pela FDA: Segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva” pela avaliação de efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento; Segmento II “Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade”, com exposição da progênie durante a fase de organogênese; e Segmento III “Toxicidade peri e pós-natal” onde são avaliados os efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação (OECD, 1998; LEMONICA *et al.*, 2001).

Peumus boldus Molina - Monimiaceae, conhecido como boldo-verdadeiro, é natural do Chile e confundido com frequência, no Brasil, com o falso-boldo (*Coleus barbatua* - Lamiaceae) (MENGUE *et al.*, 2001). Seu principal alcaloide é a boldina, (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-apomorfina, que também está presente no falso-boldo, apresentando atividades farmacológicas como atividade citoprotetora, antitumoral, anti-inflamatória, antipirética, antiplaquetária, entre outras (O'BRIEN *et al.*, 2006).

As informações sobre os possíveis usos das plantas medicinais e seus efeitos tóxicos, principalmente quando utilizadas durante o período gestacional, são muitas vezes escassas e contraditórias. *P. boldus* é utilizada durante a gestação para diminuir efeitos desagradáveis da gestação como náuseas, cólicas uterinas e constipação (SPETHMANN, 2003), e contraditoriamente também é dita a terceira planta mais utilizada como emenagoda/abortiva num estudo realizado no Serviço Pré-natal do SUS (Sistema Único de Saúde do Brasil), segundo MENGUE *et al*, 1997; tendo a boldina, seu principal alcaloide, demonstrando atividade abortiva em altas doses.

A realização de ensaios de avaliação toxicológica é de extrema importância para atestar que o alcaloide boldina presente na planta *P. boldus*, não exerce atividades tóxicas que inviabilizem seu uso com fins terapêuticos por gestantes em doses presentes no chá. Muitas plantas medicinais, como *P. boldus*, são facilmente encontradas em feiras livres e farmácias ou mesmo são cultivadas no quintal de casa, facilitando assim o acesso da mulher gestante a estes produtos.

Os estudos pré-clínicos em modelos animais, apontam substâncias que apresentam capacidade de alterar aspectos fisiológicos como reprodução, fertilidade dos mamíferos e comportamento da prole. A exposição de ratas *Wistar* prenhas ao alcaloide boldina, nesse estudo, visa analisar efeitos significativos no desenvolvimento (fetal e pós-natal), reprodução e comportamento dos animais, de forma a caracterizar o aspecto toxicológico deste alcaloide. A realização desses ensaios de avaliação toxicológica é de extrema importância para atestar que os compostos químicos presentes na planta em estudo não exercem atividades tóxicas que inviabilizem seu uso com fins terapêuticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir com conhecimentos sobre a utilização do alcaloide boldina especialmente no que se refere à toxicidade reprodutiva de forma a indicar o grau de segurança deste alcaloide encontrado em *Peumus boldus*, como agente terapêutico.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do alcaloide boldina sobre fêmeas tratadas durante o período gestacional (Segmento I).

Avaliar os efeitos do alcaloide boldina sobre o desenvolvimento da progênie exposta durante as fases de desenvolvimento fetal (Segmento III).

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Boldo (*Peumus boldus*)

Boldo (*Peumus boldus* Mol., Monimiaceae) é um caso de planta medicinal cujo uso está enraizado na medicina popular e que, posteriormente, tem sido objeto de atenção considerável do ponto de vista farmacológico. A ampla base de conhecimento químico de seus constituintes alcaloides (isolamento, identificação e quantificação) e sua percepção cultural ampla como uma planta medicinal eficaz para o tratamento de distúrbios digestivos e hepatobiliares são os dois principais fatores que contribuíram para o recente ressurgimento de interesse no boldo (SPEISKY; CASSELS, 2010).

P. boldus é originário de regiões montanhosas do Chile (HOFFMAN, 1981; SAN MARTÍN; DOLL, 1998), sendo conhecido no Brasil como “boldo” ou “boldo-do-Chile”. É um arbusto ou arvoreta, dioico (HOFFMAN, 1981), de folhas opostas, inteiras, curtamente pecioladas, flores unissexuais, pistiladas e estaminadas e frutos do tipo drupa (HÉRAIL, 1927; MINISTÉRIO DA SAÚDE DE LISBOA, 2002).

Elaborações farmacêuticas contendo extratos de folhas de boldo têm sido empregadas para o tratamento de uma variedade de sintomas e doenças como reumatismo, dores de cabeça, distúrbios menstruais, inflamações do trato urinário e dispepsia, além de sedativo (SPEISKY; CASSELS, 1994; O'BRIEN *et al.*, 2006).

Hoje em dia é popularmente empregado devido a suas propriedades digestivas (JIMÉNEZ; SPEISKY, 2000). As principais atividades farmacológicas que lhe são atribuídas são: atividade estimulante de secreções gástricas, facilitando a digestão (BRUN, 1936; PLANCHON *et al.*, 1946; COIMBRA; SILVA, 1958; PARIS; MOYSE, 1967; HOFFMAN, 1981; BISSET; WICHTL, 1994; GUPTA, 1995; AMERICAN BOTANICAL COUNCIL, 1995; DUKE, 2000); ação como antidispéptico (AMERICAN BOTANICAL COUNCIL, 1995; PDR, 2000; BRUNETON, 2001) coletérico (HÉRAIL, 1927; BRANDT; GILG, 1942; PLANCHON *et al.*, 1946; COIMBRA; SILVA, 1958; PARIS; MOYSE, 1967; BISSET; WICHTL, 1994; DUKE, 2000; PDR, 2000; NEWALL *et al.*, 2002; THE REVIEW OF NATURAL PRODUCTS, 2002); atividade antiespasmódica (PDR, 2000); em associação a substâncias como a

alcachofra, é utilizado em ardores esofágicos e epigástricos, e associações com cáscara-sagrada são usadas na constipação (BRUNETON, 2001; THE REVIEW OF NATURAL PRODUCTS, 2002); uso no tratamento de cálculos biliares, cistite e colelitíase acompanhada de dor (BRUN, 1946; PARIS; MOYSE, 1967; NEWALL *et al.*, 2002), atividade diurética (HÉRAIL, 1927; PARIS; MOYSE, 1967; BISSET; WICHTL, 1994; NEWALL *et al.*, 2002). Segundo a *European Scientific Cooperative on Phytotherapy* (ESCOP, 1997), as indicações terapêuticas devem estar relacionadas a disfunções hepatobiliares menores, tratamento sintomático de distúrbios digestivos leves e como adjuvante na constipação.

O boldo é utilizado também durante a gestação para diminuir efeitos desagradáveis da gestação como náuseas, cólicas uterinas e constipação (SPETHMANN, 2003), e contraditoriamente também é dita a terceira planta mais utilizada como emenagoda/abortiva num estudo realizado no Serviço Pré-natal do SUS (Sistema Único de Saúde do Brasil), segundo MENGUE *et al* (1997).

A boldina é o alcaloide majoritário encontrado tanto nas folhas como nas cascas do boldo (SPEISKY, CASSELS, 1994; O'BRIEN *et al.*, 2006), sendo a concentração nas folhas em torno de 0,14% (QUEZADA *et al.*, 2004; GOTTELAND *et al.*, 2004), e nas cascas de até 6 % (URZÚA; ACUÑA, 1983; QUEZADA *et al.*, 2004).

3.2 Boldina

Boldina é o principal alcaloide da folha e casca de *P. boldus* (boldo chileno), sendo responsável pela maioria das atividades de promotoras de saúde descritas do extrato de boldo, que tradicionalmente foi usado para tratar uma grande variedade de doenças e sintomas, incluindo dor de cabeça, reumatismo, dispepsia, infecções do trato urinário e distúrbios do sono (O'BRIEN *et al.*, 2006). Seus efeitos foram estudados utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* e os resultados revelaram a forte atividade antioxidante da boldina, que permite a prevenção de vários resultados relacionados ao estresse oxidativo, como a hepatotoxicidade (LANHERS *et al.*, 1991; Fernandez *et al.*, 2009), inflamação (BACKHOUSE *et al.*, 1994), proliferação de células tumorais e aterosclerose (SANTANAM *et al.*, 2004).

Em baixas concentrações de micromolar, a boldina evita danos tanto enzimáticos como não enzimáticos aos sistemas biológicos. *In vitro*, a boldina inibe a iniciação e

propagação mediada pelos radicais livres causando dano oxidativo induzido a vários tipos de membrana (como homogeneizados de fígado, microssomas hepáticos e eritrócitos fantasma) e inibe a lise dependente dos radicais dos glóbulos vermelhos e hepatócitos intactos (SPEISKY, *et al.*, 1991; CEDERBAUM *et al.*, 1992; MARTINEZ *et al.*, 1992). Em outras palavras, a boldina é uma substância antioxidante muito potente para sistemas biológicos, mas apresenta muitas outras ações como mencionado a seguir.

Os efeitos atribuídos a *P. boldus*, alguns deles tóxicos, ocasionalmente foram atribuídos à presença do alcaloide boldina. De fato, existem vários estudos que analisam a atividade bioquímica deste alcaloide (RUIZ *et al.*, 2008). Algumas restrições ao uso desta planta devem ser consideradas devido aos seus efeitos tóxicos, principalmente em mulheres grávidas (ALMEIDA *et al.*, 2000).

3.2.1 Farmacocinética da boldina

Segundo a SCOPE (*Scientific Committee on Problems of the Environment*), as indicações terapêuticas do boldo devem estar relacionadas a disfunções hepatobiliares menores, tratamento sintomático de distúrbios digestivos leves e como adjuvante na constipação, os primeiros estudos realizados sobre efeito da boldina foram em relação a esta atividade.

Os primeiros estudos relatados sobre a disposição biológica da boldina foram realizados por Jimenez e Speisky (JIMENEZ; SPEISKY, 2000) *in vitro* usando hepatócitos de ratos isolados e *in vivo* usando ratos *Wistar*. Nos estudos *in vivo*, a concentração de boldina diminuiu rapidamente no plasma após uma única oral (50 ou 75 mg / kg) ou uma administração intravenosa (10 ou 20 mg / kg) em ratos (JIMENEZ; SPEISKY, 2000). Após a administração oral, a absorção de boldina no plasma foi rápida com um tipo de cinética de primeira ordem e a concentração plasmática máxima foi detectada entre os primeiros 15 e 30 minutos (meia vida da boldina no plasma é curta, 31 minutos).

Uma vez absorvida, a concentração de boldina no fígado é 3 a 4 vezes maior do que a detectada no cérebro e quase 10 vezes maior do que a encontrada no coração. Mais uma vez, os mesmos pesquisadores observaram que a concentração máxima estimada da boldina que atingiu o fígado era de 72-88 mM (JIMENEZ; SPEISKY, 2000), sendo 4- a 5 vezes maior que as concentrações necessárias para exercer sua

atividade hepatoprotectora *in vitro* (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2003; CEDERBAUM *et al.*, 1992). Do mesmo modo, a concentração de boldina encontrada no coração era de aproximadamente 7,2 a 8,8 mM, que era 7 a 8 vezes superior à utilizada para proteger a função endotelial *in vitro* (LAU *et al.*, 2013; LAU *et al.*, 2013).

3.2.2 Atividades farmacológicas da boldina

3.2.2.1 Atividade coletérica

Os efeitos agudos e a longo prazo da boldina como coletérico foram avaliados em ratos durante a infusão intravenosa ou após tratamento oral de 28 dias. A infusão de boldina aumentou instantaneamente o fluxo biliar 1,4 vezes em ratos saudáveis, bem como em animais com deficiência de Mrp2 ou colestase induzida por etinilestradiol. Este efeito não foi associado a um aumento correspondente da excreção de ácido biliar, indicando que o mesmo não está relacionado à estimulação de ácido biliar de mecanismos dependentes ou independentes de formação biliar e aponta para a atividade osmótica da própria boldina. Lévy-Appert-Collin e Lévy relataram que a aplicação direta de boldina no duodeno de ratos, na dose de 50 ou 100 mg / kg, aumentou o fluxo biliar, em 15 e 60%, respectivamente (LÉVY-APPERT-COLLIN; LÉVY, 1977).

3.2.2.2 Atividade imunomoduladora e anti-inflamatória

Seu efeito imunomodulador foi demonstrado num estudo tentando identificar os efeitos *in vitro* da boldina em células *Natural Killers* (NK), na citotoxicidade mediada por células dependentes de lectina (LDCC) e na transformação blástica induzida por lectina em pacientes com câncer de mama, com leucemia linfocítica crônica (CLL) e em doadores saudáveis. A concentração de boldina - diminuiu de forma dose dependente a blastogênese em indivíduos normais e em pacientes com CLL. No entanto, a diminuição nos pacientes com câncer de mama foi significativa apenas em concentrações mais elevadas. A atividade de NK não mostrou alterações nos controles saudáveis com valores normais (GONZÁLEZ-CABELLO *et al.*, 1994).

Além desse estudo outra razão para propor sua ação imunomoduladora é sua ação na Doença de Chagas, que ocorre principalmente por ação dos macrófagos

(MORELLO *et al.*, 1994). Os macrófagos desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Moreira e colaboradores (2001), investigaram o efeito da boldina nas funções de macrófagos peritoneais de camundongo pela liberação de H₂O₂ e descobriram que a boldina (6 mM) apresentava uma atividade moduladora muito baixa no sistema imunológico, melhorando a liberação de peróxido de macrófagos, mas pouco (MOREIRA *et al.*, 2001). A concentração da boldina muito alta empregada pelos últimos investigadores limita, no entanto, qualquer interpretação de seus resultados; estudos anteriores demonstraram seu efeito imunomodulador em concentrações mais baixas (10-30 µM) (GONZÁLEZ-CABELLO *et al.*, 1994). Verificou-se, também, que a boldina inibe a proliferação induzida por concanavalina *in vitro* de esplenócitos de rato (PHILIPPOV *et al.*, 1998). Estudos demonstram que a boldina age como anti-inflamatório causando redução dos níveis do fator de necrose tumoral α (TNF- α), do fator nuclear kappa b (NF-kb) e da interleucina 6 (IL-6) (NISHA *et al.*, 2017). Embora esses trabalhos sugerem algumas possíveis propriedades imunomoduladoras da boldina, o potencial real dessa apomorfina para modificar favoravelmente as funções imunes celulares permanece inconclusivo.

Devido a esse potencial antioxidante e anti-inflamatório, um estudo procurou avaliar as neuropropriedades da boldina em isquemia cerebral e foi concluído que 10 e 50 µM de boldina aumentaram a viabilidade celular, entretanto 100 µM causou aumento do dano tecidual (KONRATH *et al.*, 2008). Anteriormente foi demonstrado que a maior concentração da boldina encontrada no SNC ocorre em 30 minutos e que após a administração oral de 50 e 75 mg/kg, as doses no SNC são de 18 e 24 µM, respectivamente (JIMENEZ; SPEISKY, 2000).

3.2.1.3 Atividade antidiabética e anti-hipertensiva

A boldina apresentou efeito protetor endotelial significativo em modelos animais de hipertensão e do diabetes *Mellitus*, e atualmente apoia-se o papel terapêutico complementar da boldina contra disfunções endoteliais associadas a essas enfermidades (LAU *et al.*, 2015). Na aorta torácica isolada de ratos espontaneamente hipertensos, ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e camundongos db / db, o tratamento repetido de boldina melhorou significativamente as relaxações dependentes do endotélio induzidas por acetilcolina. O papel protetor endotelial da boldina correlacionou-se com o aumento dos níveis de óxido nítrico e a redução das espécies de oxigênio vasculares

reativas através da inibição das subunidades de fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidase (NADPH oxidase), p47phox e NOX2 além de seu papel na *downregulation* do receptor tipo I angiotensina II por meio da *upregulation* da proteína-4 morfogenética óssea (BMP4). Em conjunto, parece que a boldina pode exercer efeitos protetores no endotélio através de vários mecanismos, incluindo o aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico, inibindo a degradação por espécies reativas de oxigênio como descrito em doenças oxidativas relacionadas ao estresse (LAU *et al.*, 2013).

Diversos estudos demonstram a atividade da boldina no diabetes *Mellitus*. A administração da boldina (tratamento oral, 7 dias, 20 mg/kg/dia), por exemplo, reduziu o estresse oxidativo e melhorou o relaxamento endotélio-dependente em aortas de camundongos diabéticos sugerindo o uso da boldina para aliviar os efeitos vasculares do diabetes (LAU *et al.*, 2013), o uso de boldina diminuiu a oxidação do LDL (*low-density-lipoprotein*) *ex-vivo* e o tratamento oral, 1 ou 5 mg/dia, 5 vezes por semana por 12 semanas, em camundongos com aterosclerose, diminuiu a formação de lesões ateroscleróticas (SANTANAM *et al.*, 2004).

O uso da boldina no diabetes *Mellitus* também é interessante por sua atividade antioxidante, já que a formação de ROS tem sido implicada na patogênese da destruição de células β e lesão hepática no diabetes *Mellitus* (LAU *et al.*, 2013). Estudos relatam efeito de redução de glicose plasmática pela boldina, que foi associado à sua ação citoprotetora na célula β pancreática e à prevenção da formação de produtos de peroxidação (JANG *et al.*, 2000). Seu efeito antioxidante também tem efeito prevenindo alterações renais relacionadas ao Diabetes (HERNÁNDEZ-SALINAS, 2013).

Além da indicação de uso da boldina por seus efeitos na melhora vascular e por sua atividade antioxidante, causando diminuição dos níveis de glicose plasmáticos, a boldina tem potencial de ser utilizado no tratamento do diabetes *Mellitus* e com benefício para pacientes com doença cardiovascular relacionada a obesidade, pois previne e reverte a inibição de adiponectina causada por essas patologias (YU *et al.*, 2009).

3.2.1.4 Atividade antitumoral

Diversos estudos demonstram atividade anticancerígena da boldina, como em câncer de bexiga, de mama e leucemias. Estudos demonstram que seu efeito principal se

deve à ação na telomerase e à sua atividade anti-inflamatória e imunomoduladora. Em câncer urinário de bexiga foi demonstrado que a inibição induzida por boldina do crescimento celular e paragem do ciclo celular parece estar ligada à inativação da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK). Além disso, a eficácia da boldina na indução de apoptose em células T24 está correlacionada com a modulação das proteínas AKT (inativação) e glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β) (ativação) (GERHARDT *et al.*, 2014).

3.2.1.5 Ação inibitória em algumas enzimas

Além de todos seus efeitos como antioxidante, a boldina possui atividade inibitória para a enzima acetilcolinesterase (SCHWANZ *et al.*, 2010); atualmente substâncias com essas características vêm sendo consideradas como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento farmacológico da doença de Alzheimer, incentivando a investigação do potencial do alcaloide boldina para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

A boldina inibe também a atividade da tirosinase, pois contém dois grupos fenólicos hidroxilas e assim diminui a oxidação de L-DOPA; IC₅₀ foi de 6.52 ± 1.47 mM (n = 3); a boldina reage com o sítio ativo da tirosinase (SI *et al.*, 2013), indicando que a boldina é um potencial agente antipigmentação natural e fotoprotetor por sua atividade antioxidante.

3.2.1.6 Ação como antagonista de dopamina

A boldina por sua semelhança a apomorfina tem sido relatada há muito tempo como um antagonista de receptores tipo 1 e 2, e mais recentemente um estudo levantou a hipótese de ele agir como um agonista parcial de receptores dopaminérgicos (ASENCIO, 1999).

Administrado parenteralmente, a boldina, assim como outros derivados de apomorfina, exerce algumas ações centrais inibitórias que são provavelmente mediadas através do bloqueio de receptores de dopamina D2 (ZETLER, 1988). Por sua semelhança estrutural com a apomorfina (antagonista dopaminérgico) a boldina também possui descritas atividades neurolépticas *in vivo*, como efeito anticonvulsivante e

antinociceptivo, o que pode ser mediado via bloqueio de receptores dopaminérgicos tipo D2 (ZETLER, 1988).

Apesar de estudos demonstrarem que a boldina apresenta boas afinidades de ligação *in vitro* para os receptores tipo D1 e D2 (ZETLER, 1988; ASECIO, 1999), *in vivo* (i.p. 40 mg / kg), a boldina foi incapaz de deslocar o [3H] -raclopride, um ligante D2 seletivo tanto no estriado como no bulbo olfatório de camundongos; a boldina apenas deslocou marginalmente [3H] -SCH23390, um ligante D1 seletivo em estriado de camundongos (ZETLER, 1988). Dado na mesma dose, a boldina não modificou os comportamentos de escalada, de *sniffing* (respiração ativa e rápida) e de autolimpeza relacionados à apomorfina. Entretanto, no comportamento de *yawning* (bocejo) e no modelo de ereção do pênis induzido por apomorfina (associados ao receptor D2), a boldina teve ação, inibindo ambos os comportamentos em mais de 50%, mas não afetou o metabolismo da dopamina no estriado (ZETLER, 1988). Portanto, embora a boldina possa atuar como antagonista da dopamina, seu acesso, aparentemente fraco, ao menos a certas regiões do SNC (ZETLER, 1988), adicionado à sua meia-vida plasmática muito curta (31 minutos) (JIMENEZ; SPEISKY, 2000), não permite que esta propriedade seja facilmente analisada em experimentos *in vivo* (O'BRIEN *et al.*, 2006).

3.2.1.7 Ação como antagonista α -adrenérgico e nicotínico

Estudos demonstram atividade em adrenoreceptores e que com exceção da sua seletividade moderada (15 a 25 vezes) para os adrenoreceptores $\alpha 1A$, não discrimina entre os subtipos adrenoreceptores $\alpha 1$ -adrenoceptores B e D e os subtipos adrenoreceptores $\alpha 2$ A, B e C; apresentando afinidade micromolar, mostrando propriedades antagonistas do canal de Ca^{+2} mas sem especificidade para a dilatação coronária em relação à cardiodepressão.

Em linha com as últimas observações, foi demonstrado que, em concentrações entre 10^{-5} e 10^{-4} M, a boldina exerce *in vitro* um efeito relaxador da musculatura lisa em íleo de rato que é, pelo menos parcialmente, mediado por ações anticolinérgica (SPEISKY *et al.*, 1991). Foi relatado, também, que a boldina parece bloquear a atividade alfa-adrenérgica direta em *vas deferens* de rato (DE LA HERAS *et al.*, 1990). Outro estudo mostrou que este alcaloide se comporta como um bloqueador alfa-adrenérgico cardiovascular e antagonista de cálcio nos ratos (IVORRA *et al.*, 1993). A boldina também age bloqueando a ação neuromuscular em uma preparação de

diafragma de rato do músculo frênico muscular, por interação direta com o receptor pós-sináptico de acetilcolina (KANG *et al.*, 1998). O efeito relaxante muscular da boldina (IC50 de 13,5 μ M) foi reversível e dependente da concentração e sugeriu-se principalmente uma ação sobre receptores de acetilcolina nicotínicos (KANG *et al.*, 1998). Hue e colaboradores (1994), trabalhando com gânglio de barata, observaram que a boldina atuava como antagonista nicotínico específico do SNC nos insetos, sem apresentar efeitos nos receptores muscarínicos e GABAérgicos (HUE *et al.*, 1994); consistente com esse último estudo, Chuliá e colaboradores (1996) mostraram que a boldina antagonizava o adrenérgico α 1 na aorta da cobaia, mas não teve efeito sobre a contração induzida pela acetilcolina da traqueia. Assim, os dados sugerem que a boldina apresentou maior especificidade em relação ao receptor nicotínico comparado ao receptor muscarínico (CHULIÁ *et al.*, 1996).

3.2.1.8 Ação como antagonista de receptores 5-HT3

Sua ação como antagonista de 5-HT3 corrobora seu uso para combater os sintomas de doenças gastrointestinais para qual o chá de boldo tem sido utilizado há muitos anos na medicina tradicional como náusea, constipação e para cólicas intestinais, e atualmente tem estudos indicando seu uso para combater os efeitos adversos da quimioterapia e como adjuvante no tratamento do câncer por efeitos mencionados anteriormente (WALSTAB *et al.*, 2014).

3.2.3 Toxicidade da boldina

Existem muitos estudos sobre os efeitos benéficos de *Peumus boldus* e da boldina, todavia são poucos os que falam sobre os efeitos adversos causados pelo uso desta planta; um destes estudos que mostrou efeitos adversos observou alterações anatômicas e nos blastocistos e alguma atividade abortiva quando se administrou extratos de *P. boldus* e boldina durante a gestação (ALMEIDA *et al.*, 2000). Entretanto, a dose de boldina utilizada neste estudo, 500mg/kg e 800mg/kg, é alta se observarmos a concentração do alcaloide boldina na folha de *P. boldus* - estima-se que as folhas contenham aproximadamente 0,14% de boldina (QUEZADA *et al.*, 2004; GOTTELAND *et al.*, 2004), e também é grande comparada às doses utilizadas em

estudos mostrando seus efeitos benéficos, este estudo também não avaliou possível efeitos no desenvolvimento da prole ou alterações no comportamento da fêmea, que podem ocorrer devido à atividade da boldina como antagonista de dopamina e ainda uma possível inibição da enzima tirosina hidroxilase (e assim, diminuindo a concentração de dopamina no SNC), já que esse age inibindo várias enzimas como a tirosinase. Ainda, verificou-se que o falso-boldo, quando administrado a animais no período de pré-implantação causa um aumento significativo da perda embrionária, provavelmente devido a um efeito relaxante sobre a mobilidade tubária (ALMEIDA, LEMÔNICA, 2000).

Além do precedente da longa tradição de uso farmacêutico da boldina e de preparações à base de boldo, a toxicidade baixa dessa substância foi mostrada, inicialmente, pelas doses altas necessárias para induzir morte em várias espécies de mamíferos (por exemplo, 15 g de boldina, administrados oralmente, foram necessários para matar um cão de 12 kg (LABORDE, 1952); pela mesma via, 500 e 1000 mg kg⁻¹ do peso corporal foram requeridos para matar camundongos e cobaias, respectivamente (KREITMAIR, 1952). Também foi demonstrado que doses consideravelmente mais baixas, 250 e 500 mg/kg (i.v.) foram necessárias para causar morte em ratos e porquinho-da-índia, respectivamente, enquanto a dose para causar morte em gatos foi de 25 mg/kg (i.v.) (KREITMAIR, 1952). Nenhum sinal de toxicidade pôde ser observado após a administração por via oral de até 3000 mg kg⁻¹ de um extrato hidroalcoólico da folha contendo boldina para ratos (MAGISTRETTI, 1980).

Demonstrou-se que a boldina não é mutagênica no cromoteste SOS, e em várias cepas de testadores de Ames, com ou sem ativação metabólica prévia (MORENO *et al.*, 1991). Além disso, estudos mostraram que a boldina, administrada i.p. (intraperitoneal) em doses subletais, não induz sinais de genotoxicidade na medula óssea de camundongos, conforme avaliado pelo teste de micronúcleos (SPEISKY, *et al.*, 1993). A análise citogenética associada com o teste de micronúcleos fornece uma medida altamente confiável das aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas induzidas por uma substância química. A aplicação deste método, que representa um critério oficial recomendado pelo Programa Gen-Tox de Agência de Proteção Ambiental dos EUA (MAVOURNIN *et al.*, 1990), deve se tornar um procedimento de rotina na avaliação toxicológica de novos candidatos a componentes para o desenvolvimento como medicamentos ou aditivos alimentícios.

Um estudo realizado para verificar a toxicidade da boldina demonstrou um LD50 de 250 mg/kg (i.p.) em ratos, a maior parte dos animais morreu devido a uma falha respiratória (L'EVY-APPERT-COLLIN; L'EVY, 1977). Um outro estudo reportou que a boldina não induziu um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas ou trocas de cromatides irmãs *in vitro* em linfócitos humanos de sangue periférico (40ug/ml de boldina) e *in vivo* em medula óssea de camundongo (900mg/kg (p.o.) de boldina) (TAVARES; TAKAHASHI, 1994).

3.2.4 Uso da boldina no período gestacional

Todas as plantas possuem princípios ativos e assim se não utilizada, dosagem, preparação e via de administração adequada poderão causar transtornos a um indivíduo, dentre eles o aborto e efeitos teratogênicos. Há riscos para o surgimento de deformações congênicas, em casos de tentativas de aborto malsucedidas.

Os prejuízos do uso inadequado de plantas medicinais na gestação devem ser um alerta não só para mulheres em idade reprodutiva, mas também para os profissionais da área da saúde, pois exercem importante papel na prevenção de efeitos indesejáveis produzidos por plantas. Mulheres grávidas, geralmente, não avisam seus médicos sobre o uso de plantas medicinais, o que pode comprometer a sua saúde.

No Brasil, o uso de plantas medicinais é amplamente difundido e a maior parte dos fitoterápicos comercializados é de venda sem prescrição médica. A população que utiliza estes recursos raramente informa o fato aos profissionais da saúde. Um dos principais problemas da utilização destes produtos é a crença de que produtos de origem vegetal são isentos de reações adversas e efeitos tóxicos (RATES, 2001; GALLO; KOREN, 2001). A regulamentação brasileira exige que medicamentos fitoterápicos tenham sua eficácia e segurança comprovadas, inclusive segurança para uso na gravidez e lactação (BRASIL, 1996; BRASIL 2004a).

Gestantes e lactantes constituem um grupo populacional que culturalmente recorre ao uso de plantas medicinais, por acreditarem que não causam danos ao feto ou ao bebê (WEIER; BEAL, 2004). O chá de boldo é o caso de um chá que é utilizado por mulheres pelos seus efeitos benéficos, citados anteriormente, como para diminuição de náuseas, contrações uterinas e constipação, entretanto também é utilizado para fins

abortivos. Como pode-se verificar na Tabela 1, o chá de boldo é o terceiro mais utilizado no Brasil para fins abortivos.

Grande parte das plantas utilizadas como emenagogas é a mesma utilizada como abortiva, não havendo distinção clara entre estas duas intenções de uso (FOSTER, 1999). Plantas tradicionalmente utilizadas para induzir aborto são administradas em doses exageradamente elevadas, o que pode causar efeitos tóxicos em todo o organismo da mulher (BELEW, 1999; CIGANDA; LABORDE, 2003).

Dados obtidos no serviço pré-natal do Sistema Único de Saúde (SUS) de diversas capitais brasileiras apontaram as dez principais plantas utilizadas como emenagogas/abortivas por pacientes grávidas (MENGUE *et al.*, 1997). Os dados de cada uma destas plantas encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Relação das 10 plantas mais utilizadas como emenagogas/abortivas por pacientes do SUS no Brasil por Mengue et al., 1997.

Nº	Nome popular	Nome científico	Família
1	Sene	<i>Senna alexandrina</i> Mill.	Fabaceae
2	Arruda	<i>Ruta graveolens</i> L.	Rutaceae
3	Boldo	<i>Peumus boldus</i> Molina	Monimiaceae
4	Buchinha-do-norte-cabacinha	<i>Luffa operculata</i> (L.) Cogn.	Cucurbitaceae
5	Marcela	<i>Egletes viscosa</i> (L.) Less. <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.	Asteraceae
6	Canela	<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl.	Lauraceae
7	Quina-quina	<i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) K. Schum.	Rubiaceae
8	Cravo	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry	Myrtaceae
9	Aroeira	<i>Astronium urundeuva</i> (Allemão) Engl.	Anacardiaceae
10	Agoniada	<i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson	Apocynaceae

Tabela adaptada de Infarma, 2007.

Tendo em vista as dificuldades em pesquisa de teratógenos e as informações escassas a respeito de plantas medicinais com efeitos abortivos, principalmente correlacionando os efeitos aos constituintes químicos, é de extrema importância que

sejam realizados estudos de toxicidade reprodutiva de plantas medicinais, principalmente porque muitas pessoas não sabem de seus diversos usos e efeitos colaterais. Tanto pelo fato de a boldina ser o principal alcaloide presente em *Peumus bolbus*, sendo utilizada vastamente para diversas enfermidades na medicina tradicional, mas também pelo fato de ser uma substância com possibilidade de ser utilizada em diversos tratamentos é de extrema importância verificar se a boldina pode ser utilizado no período gestacional, já que se tem evidências que este poderia causar aborto e por, ao nosso conhecimento, não existir nenhum estudo realizado para verificar os efeitos que o tratamento em fêmeas progenitoras causa na prole.

3.3 Avaliação toxicológica

A legislação brasileira e internacional exige que fitoterápicos e fármacos sejam produzidos ou disponibilizados no mercado para consumo somente após a avaliação rigorosa de suas características. Para tal, devem ser realizados testes que determinem suas atividades toxicológicas e o seu potencial mutagênico (SILVA *et al*, 2003).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão regulador para registro de medicamentos fitoterápicos de uso humano e prevê a realização de estudos de toxicidade pré-clínica. O guia emitido por esse órgão tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica para fitoterápicos incluindo toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas (longa duração), estudo especial - genotoxicidade e avaliação toxicológica de medicamentos fitoterápicos de uso tópico. Os ensaios de toxicidade reprodutiva estão previstos quando o medicamento for indicado para administração de longa duração ou para gestantes (ANVISA, 2004).

3.3.1 Testes sobre toxicidade reprodutiva

A avaliação da Toxicologia Reprodutiva compreende um estudo complexo. Entende-se por reprodução o processo biológico que assegura a continuidade das espécies, possibilitando que o material genético existente seja passado às gerações seguintes. Assim sendo, o ciclo reprodutivo não versa apenas na concepção, prenhez e

nascimento, mas tem início com a produção de gametas nos genitores (no período pré-natal do organismo parenteral), continuando pela fertilização e desenvolvimento embriofetal, nascimento e desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual, quando o descendente adulto se torna capaz de procriar (MELLO, 2007).

Os agentes químicos podem afetar o ciclo reprodutivo em qualquer das suas diferentes fases, impedindo ou inibindo temporariamente a reprodução e/ou causando defeitos de desenvolvimento na prole exposta. Nas fases pré e pós-natal, os órgãos sexuais e o sistema nervoso central que ainda estão se diferenciando, podem ser atingidos por substâncias presentes no sangue materno através da placenta durante a gestação ou através do leite durante a lactação (ZENICK; KLEGG, 1989). Desta forma, os estudos de toxicidade reprodutiva devem ser igualmente abrangentes para que se possam detectar diferentes tipos de agravos nas diferentes fases do ciclo reprodutivo (LEMÔNICA *et al.*, 2001).

A exposição pré-natal e pós-natal a produtos tóxicos pode produzir mudanças imprevisíveis a partir dos efeitos observados em adultos, e esses efeitos são muitas vezes irreversíveis. Resultados adversos no desenvolvimento, em ambos os sexos podem resultar de exposição a agentes tóxicos no útero ou no leite materno (EPA, 1996).

Assim, os estudos de toxicidade reprodutiva adaptados de normas da Environmental Protection Agency (EPA), recomendados por OECD e FDA, e a serem realizados durante a execução deste projeto, abrangem três segmentos:

- segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva” onde é realizada a avaliação de efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento;
- segmento II “Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade”, com exposição da progênie durante a fase de organogênese;
- segmento III “Toxicidade peri e pós-natal” onde são avaliados os efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

Para estudos de toxicologia, frequentemente utilizam-se ratos *Wistar*, uma linhagem de ratos albinos que são preconizados por serem animais dóceis e por possuírem excelente desempenho reprodutivo. Os machos atingem a maturidade sexual logo após a puberdade (entre 60 e 75 dias de vida), sua fertilidade máxima encontra-se

entre 100 e 300 dias, e a senescência reprodutiva ocorre aproximadamente aos 360 dias de idade (EBISUI, *et al.*, 2009).

A melhor maneira para revelar efeitos reprodutivos induzidos por xenobióticos é investigar todos os parâmetros possíveis. Há vários anos os investigadores monitoram, com maior assiduidade, o comportamento animal quando estudam os efeitos reprodutivos de substâncias exógenas (CHAOULD; FAQI, 1998; FAQI *et al.*, 1998).

Durante as avaliações toxicológicas, é necessário proceder algumas análises comportamentais dos animais testados (BENNETI, 2005). O teste de acasalamento entre ratas no período de estro e machos sexualmente experientes, têm a finalidade de testar o comportamento sexual masculino (CHAOULD; FAQI, 1998), já o comportamento da rata lactante com sua ninhada objetiva garantir o bem-estar e atestar que as manipulações inofensivas e os estímulos estressores não estão induzindo alterações endócrinas e comportamentais na idade adulta, já que estes efeitos poderiam ser associados ao comportamento maternal, em que a mãe estimula com mais frequência e intensidade seus filhotes (BENNETI, 2005).

Quanto ao período gestacional a gestação de ratos difere da gestação humana e seu período perinatal pode ser dividido em quatro etapas: implantação, organogênese, desenvolvimento fetal e período neonatal. O início da prenhez, que vai da fertilização até a implantação, é um período crítico durante o qual podem ocorrer perdas gestacionais. Em roedores e humanos os processos celulares que ocorrem durante o período de perifertilização (meiose, ovulação e fertilização) são similares (CASTRO *et al.*, 2007). O período neonatal tem seu início no nascimento da prole e é finalizado até o término da lactação. Nesse período ocorre a maturação funcional e o ganho de peso corporal. Por outro lado, o ambiente inicial do neonato é determinado pela mãe, que é responsável por sua sobrevivência (CASTRO, 2006).

3.3.2 Desenvolvimento dos filhotes

Em animais, podem-se utilizar alguns testes para avaliar o desenvolvimento e o comportamental pós-natal dos filhotes. Os testes são importantes para determinar se há alteração quanto ao peso, desenvolvimento, maturação e comportamento dos filhotes pela exposição a substâncias administradas (ABEL; DINTCHEFF, 1978).

Ratos de laboratório nascem pesando entre 5 – 7 g no dia zero, com os olhos fechados e a cavidade do ouvido obstruída por pele; além disso, as narinas estão abertas para a respiração e os animais possuem dente de leite, mas os dentes incisivos ainda não nasceram. As patas traseiras e dianteiras são bem formadas, mas os filhotes não têm capacidade de ficar em pé, agarrar ou engatinhar (GERRISH; ALBERTS, 1995).

O desenvolvimento pós-natal ocorre rapidamente e a cada dia a aparência dos filhotes sofre mudanças. O ganho de peso é considerado o melhor indicador do estado de saúde dos filhotes e é necessário um aumento regular na massa muscular, no crescimento e na diferenciação do esqueleto do animal, acompanhado de um suporte antigravitacional para sustentação dos movimentos. Os animais são pouco capazes de manter a temperatura corporal sem auxílio da mãe por volta do dia 5, quando ocorre um aumento do tecido adiposo subcutâneo, fornecendo um maior isolamento térmico, além do aparecimento de penugem ao longo do corpo e a partir do dia 8 nascimento do pelo (GERRISH, ALBERTS, 1995).

O desenvolvimento das funções sensoriais nos filhotes ocorre, na seguinte ordem, para todos os vertebrados: tátil, vestibular, auditiva e visual (ALBERTS, 1984). A função vestibular pode ser demonstrada com testes de reflexos. Já no 2º dia o neonato é capaz de exercer o reflexo de orientação dorsoventral, embora se torne mais evidente com a idade. Os filhotes, com o passar do tempo, desenvolvem estratégias para a reorientação dorsoventral a fim de facilitar o seu desempenho (WHISHAW; KOLB, 2005). Já a geotaxia tem sido considerada uma das respostas reflexas mais características dos ratos (KREIDER; BLUMBERG, 2005).

Em ratos, o equivalente ao terceiro trimestre gestacional humano ocorre após o nascimento, ou seja, o período pós-organogênese é extrauterino, sendo os 7-10 primeiros dias de vida pós-natal o período que representa o maior crescimento neuronal (WEINBERG *et al.*, 2008).

Indivíduos expostos durante períodos críticos de desenvolvimento são mais vulneráveis à ação de substâncias químicas em função de menor capacidade metabólica e excretora e da ausência de muitos mecanismos de retroalimentação do sistema endócrino (ZENICK e KLEGG, 1989). Cada um dos sistemas em formação apresenta um período crítico específico em que se encontram mais suscetível ao agente e quanto maior for este período, maior também será a suscetibilidade (BERNARDI, 2014). Os períodos críticos do desenvolvimento do rato estão ilustrados na Figura 1.

Dias de gestação			Dias de lactação
1-5	6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21		1 – 21 pós-natal
Implantação	Organogênese	Desenvolvimento fetal	Neonatal
Divisão do zigoto Implantação Formação do blastocisto	Olho		
	Cérebro	Maturação e diferenciação do cérebro	
	Coração e arcs aórticos		
	Esqueleto axial		
	Palato		
	Sistema urogenital		

Figura 1. Períodos de desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato. Adaptado de Bernardi, 2014.

O período neonatal (fase final do período perinatal) tem seu início ao nascimento da prole, sendo finalizado com o término da lactação. Ocorre a maturação funcional e o ganho de peso corporal, nesse período. Por outro lado, o ambiente inicial do neonato é determinado pela mãe que é responsável pela sobrevivência dos filhotes. A mãe é a primeira fonte de conforto térmico, alimentação e limpeza, determinando primariamente o desenvolvimento da arquitetura do cérebro após o nascimento (CASTRO, 2006).

Intervenções na relação mãe-filhotes podem afetar comportamentos emocionais e respostas ao estresse na vida adulta (HUOT, 2004). Assim, a interação mãe-filhotes é crucial para o crescimento somático e o desenvolvimento comportamental (CASTRO, 2006).

Para observar o desenvolvimento, a maturação e o comportamento dos filhotes expostos a substâncias investigadas para toxicidade reprodutiva durante o período gestacional, investiga-se alterações em testes que compreendem respostas reflexas, de orientação, de força, atividade locomotora e ansiedade, além do registro de peso, observação da abertura de olhos, erupção dos dentes incisivos, e características reprodutivas como descida de testículos, abertura do canal vaginal e a separação prepucial dos machos (GIOVANA, 2009).

3.3.2.1 Observação de reflexos

3.3.2.1.1 Geotaxia negativa

A geotaxia negativa é um teste que remete à função vestibular e à propriocepção (ROBERGS; ROBERTS, 2002), descrevem que o aparelho periférico consiste de um conjunto de sensores do movimento, o qual envia informações ao sistema nervoso central, especificamente ao complexo nuclear vestibular e ao cerebelo, sobre a velocidade angular da cabeça. A aceleração linear é a orientação cefálica em relação ao eixo gravitacional. O sistema nervoso central processa esses sinais e os combina com outras informações sensoriais, para estimar a orientação cefálica. A resposta do sistema vestibular central é transmitida aos músculos extraoculares e à medula espinhal para preparar dois importantes reflexos, o reflexo vestibulo-ocular (gera os movimentos oculares) e o reflexo vestibulo-ocular (gera o movimento corporal de compensação, mantendo a estabilidade cefálica e postural, evitando quedas). O desempenho desses reflexos é monitorizado pelo SNC e, quando necessário, eles são reajustados por processos adaptativos (ROBERT; SCOTT, 2002).

3.3.2.1.2 Reflexos postural e reflexo de agarrar

O desenvolvimento sensório-motor adquire importância vital na avaliação evolutiva da maturidade da função motora (sistema piramidal, extrapiramidal e cerebelar) do ponto de vista neurológico. Como já mencionado, os neonatos demonstram reflexo postural, que se torna mais importante com a idade, iniciando no dia 1 e com o passar dos dias, o animal adquire estratégias posturais torna-se mais rápido na realização da tarefa (WHISHAW; KOLB, 2005). O rato desenvolve a habilidade de “agarrar”, entre o dia 14 e o dia 17 pós-natal. A força muscular despendida é testada através de teste de força, onde o animal deve ser capaz de sustentar o peso de seu próprio corpo por um tempo determinado (GIOVANA, 2009).

3.3.3 Comportamento materno e suas vias

O comportamento materno pode ser definido como o comportamento da fêmea lactante em relação a sua prole imatura. Este comportamento inclui a posição de

aleitamento, que promove nutrição e calor aos filhotes, o comportamento de busca e agrupamento dos filhotes ao ninho e a construção do ninho (NUMAN, 1994).

A mãe desempenha um importante papel no desenvolvimento das respostas ao estresse. Os filhotes que recebem maior quantidade de cuidado materno apresentam resposta reduzida de corticosterona quando adultos, se submetidos a estresse (ANISMAN *et al.*, 1998). Também apresentam maior atividade no campo aberto e menor latência para iniciar a comer em um novo ambiente (CALDJI *et al.*, 1998).

O estímulo tátil é extremamente importante para o desenvolvimento normal da maioria dos mamíferos. Nos ratos, o principal estímulo tátil nos filhotes é o comportamento de lambar o corpo e a região anogenital destes. Este comportamento, descrito como tão importante quanto à lactação, tem papel nos sistemas neurais e altera a plasticidade do sistema nervoso central (VAN OERS *et al.*, 1998).

Ao nascerem, os mamíferos não estão com o sistema nervoso plenamente desenvolvido. Nos ratos, o sistema nervoso está suscetível a alterações ambientais logo após o nascimento. O desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse pode ser modificado por eventos que ocorrem durante este período (MEANEY *et al.*, 1993).

O período neonatal corresponde ao período onde as ligações sociais do animal são primariamente formadas (SCOTT, 1962). Durante esta fase o organismo está altamente sensível aos efeitos de estímulos ambientais, como, a manipulação por parte do experimentador, ou alterações no comportamento materno. As estimulações neonatais que induzem as alterações comportamentais e neuroendócrinas parecem persistir ao longo da vida do animal (FRANCIS *et al.*, 1996).

A separação da mãe por longos períodos pode alterar as vias de resposta ao estresse, pois a mãe é a primeira ligação entre o filhote e o meio ambiente (FRANCIS; MEANEY, 1999) e a alteração desta relação pode alterar a diferenciação do sistema nervoso dos filhotes.

O desenvolvimento do eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) é afetado por eventos que aconteceram no início da vida. Durante esta fase, nos roedores, os receptores de glicocorticoides do hipocampo demonstram plasticidade (FRANCIS *et al.*, 1996).

Nos ratos, o comportamento materno ocorre com uma frequência maior nos primeiros 10 dias após o parto (GROTA, 1969), já que os filhotes de ratos nascem parcialmente imóveis, desprovidos de pelos, surdos e cegos, incapazes de se locomover e de regular sua temperatura; e sua dependência em relação à mãe diminui a partir daí,

conforme aumenta a autonomia dos filhotes. Até o 12º dia de vida, aproximadamente, é a mãe que toma a iniciativa de se aproximar dos filhotes. Após este período, os filhotes que se aproximam da mãe para quando necessitam de cuidados, já que estão aptos a se locomover e a deixar o ninho (LEON, 1971). Depois de duas semanas do nascimento há um declínio gradual dos cuidados da progenitora em relação aos filhotes, até que a rejeição dos filhotes pela mãe no desmame ocorra (REISBICK, 1975).

Após o parto, a progenitora lactante se engaja em manter uma série de cuidados com os filhotes (*Pup Nursing*). Na maior parte do tempo ela fica sobre eles, para aquecê-los (GROTA, 1969). Ela pode se manter por cima dos filhotes com uma postura arqueada, o que faz com que as mamas fiquem mais expostas e facilita a ejeção do leite quando os filhotes realizam a sucção (STERN, 1990). Ao parirem, as lactantes passam até 85% do tempo total juntos aos filhotes (GROTA, 1969), o que diminui consideravelmente a quantidade de bebida e ração consumida pela progenitora.

Como mencionado, o comportamento de lambar os filhotes (*Pup Licking*) também é importante; este comportamento ocorre por todo o corpo e pela região anogenital (períneo) e seu propósito é estimular a excreção dos filhotes e, além disto, serve como reposição de água e eletrólitos para a mãe lactante, já que ela ingere a urina dos filhotes (GUBERNICK; ALBERTS, 1985). O comportamento de lambar ocorre em alta frequência nos primeiros dias após o parto e a frequência de lambar a região anogenital é maior nos filhotes machos que nas fêmeas (MOORE; MORELLI, 1979). O comportamento de lambar os filhotes é um importante estímulo tátil que pode influenciar no desenvolvimento social dos filhotes machos e fêmeas quando adultos, sendo o comportamento sexual muito importante neste quesito (BIRKE; SADLER, 1987; MOORE, 1992). Estímulos olfatórios e a quantidade de urina estão envolvidos na frequência de duração deste comportamento (MOORE; POWER, 1992). Este comportamento influencia o comportamento materno futuro, pois os filhotes fêmeas que receberam uma quantidade de lambidas maior ficarão mais tempo com seus filhotes quando forem mães (FRANCIS *et al.*, 2000).

As vias que influenciam o comportamento materno são muito estudadas, todavia ainda não estão plenamente claros todos os constituintes presentes. A regulação do comportamento materno em ratos ocorre em duas fases (NUMAN, 1994). O início natural do comportamento materno ocorre no dia do parto, e é controlado por vários hormônios relacionados com a gestação (estrogênio, progesterona, prolactina e ocitocina). A fase de manutenção do comportamento materno ocorre durante o período

pós-parto, e é controlado principalmente por fatores não hormonais (ou seja, os estímulos multissensoriais fornecidos por filhotes) (SILVA *et al.*, 2001). Extensas pesquisas delinearão os circuitos neurais básicos que medeiam a expressão do comportamento materno. A visão atual é que os sistemas de dopamina (DA) mesolímbica e mesocorticais fazem parte de um sistema motivacional não específico ou geral, que serve para aumentar a capacidade de resposta de um organismo a uma vasta variedade de estímulos biologicamente significativos, incluindo os filhotes (CHEN *et al.*, 2014), e que a DA está envolvida em ambas as fases de regulação do comportamento (BRIDGES, 1996).

A serotonina é um neurotransmissor importante ligado em muitos processos psicológicos relevantes para o comportamento materno (VEIGA *et al.*, 2007); estudos mostram que uma alteração nesta via pode romper o comportamento materno (CHEN *et al.*, 2014).

Alterações causadas por administração de substâncias podem causar depressão materna durante a gestação e/ou o período pós-parto que afeta não só o bem-estar da mãe, mas também o desenvolvimento da prole (MURRAY; COOPER, 1997; MURRAY *et al.*, 2007). Sabe-se que o estresse crônico pode afetar o comportamento, emoção, cognição e morfologia do cérebro (GALEA *et al.*, 1997; SOUSA *et al.*, 2000). Estudos demonstraram que a dopamina está envolvida em ambas as fases do comportamento materno (LONSTEIN *et al.*, 1998; HANSEN, 1994; HANSEN *et al.*, 1991; HANSEN, 1991; BRIDGES, 1996; NUMAN, 2007; NUMAN, 2005; FEBO *et al.*, 2010).

Estudos com lesões no núcleo *accumbens* mostraram que neurônios dopaminérgicos que inervam este local podem ser particularmente importantes para os aspectos locomotores do comportamento materno, como o comportamento de busca dos filhotes (HANSEN *et al.*, 1991; HANSEN, 1991). Todavia, lesões no caudado-putâmen (estriado dorsal) não causaram nenhum efeito sobre ambas as fases do comportamento materno (HANSEN *et al.*, 1991).

Como é sabido, o sistema dopaminérgico mesolímbico está envolvido em processos motivacionais, tais como recompensa e reforço (STERN; KEER, 1999). Expor a mãe aos filhotes (reforçando estímulos) induz a liberação DA no núcleo *accumbens* e *striatum* dorsal (FLEMING *et al.*, 1994). Substâncias que bloqueiam os receptores D2 *like* de DA como o haloperidol (0.1 mg/kg) induzem redução no comportamento de busca dos filhotes e na qualidade do ninho (SILVA *et al.*, 2001).

Já que a boldina é um bloqueador dos receptores dopaminérgicos (ZETHER, 1988; ASECIO, 1999), seu uso crônico pode causar alterações no comportamento materno, já que a via dopaminérgica está muito relacionada com o comportamento materno; além de haver uma possível ação como inibidor da tirosina hidroxilase, diminuindo assim os níveis de DA, já que age na enzima tirosinase (SI, *et al.*, 2013).

4 METODOLOGIA E RESULTADOS

O presente estudo apresenta os métodos utilizados e os resultados obtidos na forma de artigos. Foram escritos 2 artigos conforme descrito a seguir:

4.1 ARTIGO 1 – BOLDINA ADMINISTRADA DURANTE A GESTAÇÃO ALTERA O DESENVOLVIMENTO DA PROLE

RESUMO

A boldina é o principal alcaloide encontrado em *Peumus boldus*, muito utilizado na medicina tradicional por seus efeitos gastrointestinais e hepáticos; atividades farmacológicas como colegoga, hipnótica, citoprotetora, antitumoral, anti-inflamatória, antipirética, antiplaquetária, antiplasmódica, antidiabética, anti-hipertensiva, inibidora da tirosinase e da acetilcolinesterase, antagonista dopaminérgico (receptores D1 e D2 *like*), adrenérgico (receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$) e serotoninérgico (receptores 5-HT₃), tem sido atribuídas ao seu uso (O'BRIEN *et al.*, 2006). O chá de *P. boldus* é também utilizado por gestantes para aliviar os efeitos negativos da gestação como constipação, cólicas uterinas, cefaleia e náuseas; controverso a esse uso ele também é utilizado como abortivo (MENGUE, *et al.*, 1997). O intuito deste estudo foi identificar a ação da boldina sobre a prole de fêmeas tratadas durante o período gestacional, dia gestacional 1 (GD1) ao parto, diariamente por gavagem, ciclo claro, 1ml/100g peso corpóreo, nas doses de 1mg/kg, 10mg/kg e 100mg/kg. Concluiu-se que o uso da boldina e do chá de *P. boldus* deve ser evitado durante o período gestacional pois sua administração durante esse período causa alterações no desenvolvimento da prole, em seu desempenho nos testes de reflexos (teste de endireitamento, geotaxia e agarrar), físico (abertura de olhos) e reprodutivo (abertura vaginal, descida de testículos e separação prepucial), gerando, também, alterações no peso de órgãos de machos e fêmeas da prole na puberdade, na produção diária de espermatozoides e no percentual de espermatozoides com alteração (anormais).

Palavras-chave: toxicidade reprodutiva, boldine, *Peumus boldus*, desenvolvimento filhotes, substâncias abortivas, reprodução

ABSTRACT

Boldine is the main alkaloid found in Peumus boldus, widely used in traditional medicine for its gastrointestinal and hepatic effects; pharmacological activities such as, colegog, hypnotic, cytoprotective, antitumoral, anti-inflammatory, antipiretic, antiplatelet, antiplasmodic, antidiabetic, antihypertensive, tyrosinase and acetylcholinesterase inhibitor, dopaminergic antagonist (D1 and D2 like receptors), adrenergic antagonist ($\alpha 1$ and $\alpha 2$ receptors) and serotonergic antagonist (5-HT₃ receptors) have been attributed to its use (O'BRIEN et al., 2006). P. boldus tea is also used by pregnant women to relieve the negative effects of pregnancy such as constipation, uterine cramps, headache and nausea; Controversely to this use it is also used as abortive (MENGUE, et al., 1997). The aim of this study was to identify the

effect of boldine on the offspring of gestational females treated during the gestational period, gestational day 1 (GD1) at delivery, daily by gavage, light cycle, 1ml / 100g body weight at doses of 1mg/kg, 10mg/kg and 100mg/kg. We concluded that the use of boldine and P. boldus tea should be avoided during the gestational period because its administration during this period causes changes in offspring development, on its performance in the reflex tests (righting, geotaxia and grab), physical (eye opening) and reproductive (vaginal opening, descent of testicles and preputial separation), and also alters the weight of male and female organs off the offspring at puberty, daily sperm production and the percentage of spermatozoa with alteration (abnormal).

Key words: reproductive toxicity, boldine, Peumus boldus, offspring development, abortive substances, reproduction

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é vastamente difundido por todo o mundo e a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que o uso de plantas medicinais tem grande importância (WHO, 2005). O chá de boldo (*Peumus boldus*) é muito utilizado por gestantes para aliviar os efeitos negativos da gestação como, constipação, cólicas uterinas, cefaleia e náuseas; controverso a esse uso ele também é muito utilizado para efeitos abortivos (MENGUE *et al.*, 1997).

A boldina é o principal alcaloide encontrado no *P. boldus*. É muito utilizado na medicina tradicional principalmente pelos seus efeitos gastrointestinais e hepáticos, tendo sido demonstrada diversas ações farmacológicas como atividade, colegoga, hipnótica, citoprotetora, antitumoral, anti-inflamatória, antipirética, antiplaquetária, antiplasmódica, antidiabética, anti-hipertensiva, inibição da tirosinase e da acetilcolinesterase, e seu uso como antagonista dopaminérgico (receptores D1 e D2 *like*), adrenérgico (receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$) e serotoninérgico (receptores 5-HT₃) , entre outras (O'BRIEN *et al.*, 2006).

A exposição pré-natal (uterina) a diversos fármacos pode produzir alterações muitas vezes irreversíveis ao desenvolvimento da prole (EPA, 1996). O feto é especialmente vulnerável a danos em virtude da exposição a compostos químicos que atravessam a placenta e/ou a barreira cerebral ainda imatura, além disso, durante o seu desenvolvimento existem períodos que são críticos para a evolução normal (RICE; BARRONE, 2000; COSTA *et al.*, 2004). Além disso, indivíduos expostos durante períodos críticos de desenvolvimento são mais vulneráveis à ação de substâncias químicas em função da menor capacidade metabólica e excretora e da ausência de

muitos mecanismos de retroalimentação do sistema endócrino (ZENICK; KLEGG, 1989). As características do concepto e sua capacidade de desenvolvimento e maturação são expressões da capacidade de fertilização de células germinativas, concepção bem-sucedida e o subsequente desenvolvimento intrauterino. O desenvolvimento peri e pós-natal depende do potencial de desenvolvimento do indivíduo e de sua habilidade de enfrentar variadas circunstâncias ambientais (MELLO; LANGELOH, 2006).

Em animais, podem-se utilizar alguns testes para avaliar o desenvolvimento e o comportamental pós-natal dos filhotes. Os testes são importantes para determinar se há alteração quanto ao peso, desenvolvimento, maturação e comportamento dos filhotes pela exposição a substâncias administradas (ABEL; DINTCHEFF, 1978).

Devido a importância de se verificar a toxicidade reprodutiva deste alcaloide por seu uso em gestantes, nesse estudo foram investigados os efeitos da boldina na prole de ratas *Wistar* a partir da exposição materna durante o período gestacional, dia gestacional 1 (GD1) até o dia anterior ao parto, nas doses de 1mg/kg, 10mg/kg e 100mg/kg. A prole teve seu acompanhamento de desenvolvimento corporal, reprodutivo e comportamental.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e tratamentos

A boldina foi adquirida da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Brasil Ltda

Para avaliar os efeitos da boldina no comportamento e desenvolvimento corporal e sexual da prole de fêmeas tratadas com boldina durante o período gestacional, foram utilizados 30 machos e 95 fêmeas nulíparas, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), acasalados em uma proporção de três fêmeas para cada macho. O início da gestação (GD0) foi constatado através de esfregaço vaginal contendo espermatozoides. A boldina foi administrada nas fêmeas prenhas uma vez ao dia, via oral (gavagem) em um volume de 1ml/100g de peso corporal a partir do dia 1 da gestação (GD1) ao dia anterior ao parto. A toxicidade foi avaliada utilizando-se três doses espaçadas geometricamente, conforme recomendado por ANVISA, OECD, FDA, sendo a menor dose 0,001g%, a dose que contém a quantidade de boldina presente em 40g de folhas de *P. boldus*, quantidade recomendada para tratamento de náuseas (SPETHMANN, 2003); estima-se que as folhas de *P. boldus* contêm aproximadamente 0,14% de boldina (QUEZADA *et al.*, 2004; GOTTELAND *et al.*, 2004). Com base

nessas informações foram propostas as seguintes doses de tratamento nas fêmeas progenitoras e a progênie foi dividida em quatro grupos experimentais de acordo com esse tratamento:

Grupo I – Controle negativo, descendentes de fêmeas tratadas com salina.

Grupo II – Dose 1 (1 mg.kg^{-1}), descendentes de fêmeas tratadas com boldina na concentração de 0,001% (1BD).

Grupo III – Dose 2 (10 mg.kg^{-1}), descendentes de fêmeas tratadas com boldina na concentração de 0,01% (10BD).

Grupo IV – Dose 3 (100 mg.kg^{-1}), descendentes de fêmeas tratadas com boldina na concentração de 0,1% (100BD).

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em biotério sob condições constante de umidade ($50\% \pm 5$), temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$), ciclo de luz claro/escuro de 12h e alimentados com ração comercial (Nuvital CR 1, Nuvital, Colombo, PR) e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRGS, Porto Alegre, RS, número 29477.

2.2 Protocolos Experimentais

Todos as análises e testes foram realizados durante o ciclo claro pela manhã.

2.2.1 Avaliação geral da prole

No primeiro dia pós-natal (PND1) os filhotes foram contados, sexados e selecionados, aleatoriamente, oito filhotes por fêmeas, sempre mantendo a mesma proporção de machos e fêmeas, quando possível, visando que todos os filhotes recebam a mesma quantidade de alimento da fêmea e seus cuidados. Cada filhote foi avaliado quanto ao desenvolvimento físico geral como recomenda OECD 416 (2001) para as seguintes características: dia do aparecimento da penugem, dia do descolamento dos pavilhões auriculares, dia do desenvolvimento do pelo, dia da erupção dos dentes incisivos, dia da abertura dos olhos, dia da descida dos testículos, dia da separação prepucial e o dia de abertura vaginal (OECD, 2001). A observação dessas característica

é de extrema importância para verificar possíveis alterações no desenvolvimento físico e reprodutivo dos animais (GIOVANA, 2009) .

Para determinar a idade à puberdade, foi avaliada a separação balanoprepucial, que consiste na separação da membrana prepucial e externalização da glândula do pênis e nas fêmeas foi verificada a abertura do canal vaginal (KORENBROT *et al.*, 1977). Este procedimento foi iniciado no PND33 e continuado, uma vez ao dia até a constatação da separação balanoprepucial através de cuidados a manipulação do tecido.

As demais características foram observadas diariamente de acordo com a taxa esperada para aparecimento das características.

2.2.2 Desenvolvimento físico geral

Os reflexos dos filhotes foram avaliados individualmente e de acordo com adaptações de Castro e colaboradores (2000) e Castro (2006). Do PND2 ao PND5 foi avaliado o reflexo de endireitamento, onde cada animal foi colocado em decúbito dorsal e cronometrado o tempo gasto para ele voltar ao decúbito ventral. Do PND7 ao PND10 foi avaliada a geotaxia negativa, onde o animal foi colocado com as quatro patas em um plano inclinado de 30°, com a cabeça voltada para o lado mais baixo e cronometrado o tempo até o animal reorientar o corpo com um giro de 180°. Do PND14 ao PND17, os animais foram seguros pela cauda e encorajados a agarrar-se com os dois membros anteriores em uma barra cilíndrica, ficando suspensos; foi cronometrado o tempo que o animal conseguiu ficar suspenso, avaliando assim, a resposta de agarrar.

O desmame foi realizado no PND21 e, no PND65 um macho e uma fêmea de cada ninhada foram selecionados aleatoriamente e eutanasiados para a avaliação da histologia e peso de órgãos. Nos machos ainda foi realizada a coleta de testículos, epidídimos e ductos deferentes para verificar a produção espermática e a verificação de possíveis alterações morfológicas nos espermatozoides.

2.2.3 Peso e histologia dos órgãos

No PND65, um macho e uma fêmea de cada ninhada foram eutanasiados e coletados rins, fígado, baço e coração, com vistas à avaliação de possíveis alterações macroscópicas. A massa de cada órgão foi mensurada e relacionada com a massa corporal do indivíduo. Dos órgãos sexuais masculinos, passaram pelo mesmo

procedimento: testículos, epidídimos, ductos deferentes, próstata e vesícula seminal, esta última foi drenada antes da pesagem. Dos órgãos sexuais femininos, passaram também pelo procedimento acima descrito os ovários e o útero. Todos os órgãos, exceto um testículo por animal, foram fixados em solução de formalina tamponada. Um testículo por grupo foi fixado em solução de Bouin, tratado com álcool, embebido em parafina e cortes de 5µm foram preparados em lâminas e corados com hematoxilina eosina. Todos os órgãos foram examinados histologicamente no Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

2.2.4 Avaliação espermática

As contagens espermáticas foram realizadas de acordo com o que foi previamente descrito por Piffer e colaboradores (2009) e Robb e colaboradores (1978). Os testículos e epidídimos foram pesados, a túnica albugínea removida e o parênquima homogeneizado em 10 mL de solução salina contendo Triton 0,5%, seguindo a sonicação por 30 s. As amostras foram diluídas 10 vezes em solução salina e as espermátides maduras resistentes foram contadas nos quatro quadrantes laterais do hemocitômetro. Os valores foram subsequentemente divididos por 6,1 dias para calcular a produção diária de espermatozoides. A cauda do epidídimo foi cortada, homogeneizada e diluída como descrito para os testículos e nesta foram contados os espermatozoides nos quatro quadrantes laterais do hemocitômetro.

As características morfológicas espermáticas (alterações em cabeça ou cauda do espermatozoide) foram analisadas através de esfregaço do lavado do ducto deferente (0,1 mL) em lâmina corada com eosina 2% (0,1 mL). Foram analisados 200 espermatozoides por animal em microscópio óptico.

2.2.5 Teste de comportamento em campo aberto

No PND75, oito machos de cada grupo tiveram seu comportamento testado através do teste de campo aberto com adaptações de Asano (1989). Cada animal foi colocado em uma arena quadrática de 1m² com paredes de 50 cm de altura e base dividida em quadrantes de 20 cm² perfazendo divisão de 25 quadrados. O comportamento do animal foi registrado em vídeo durante 5 minutos. O teste foi

realizado durante o ciclo claro e foram analisadas as seguintes categorias comportamentais: frequência de entrada no centro, frequência de entrada na periferia, permanência sobre as duas patas traseiras (*rearing*), autolimpeza (*grooming*) e quantidade de bolos fecais.

2.2.6 Análise dos testes de comportamento

Todos os testes de comportamento realizados foram registrados usando câmera de vídeo digital e analisados através do software Behavsoft[®] (patente pendente). Este programa permite uma análise precisa do comportamento em tempos selecionados pelo usuário, através de uma única interface usando comandos de atalho do teclado (COSTA *et al.*, 2015).

2.2.7 Análise estatística

As variáveis em questão foram primeiramente submetidas a teste de normalidade (Shapiro-Wilk). A análise estatística incluiu a análise de variância de uma via (ANOVA), Kruskal-Wallis e qui-quadrado. As variáveis quantitativas seguiram o teste de Kruskal-Wallis e as qualitativas qui-quadrado ou Kruskal-Wallis. Após, foi realizado o teste de Tukey para as amostras paramétricas e o teste de análise múltipla de Dunn para amostras não-paramétricas. Todas as análises foram executadas usando o programa GraphPad Prism 7. Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando o valor de *P* foi menor que 0,05. Os valores foram expressos como média e erro padrão da média (EPM).

3 RESULTADOS

Os resultados referentes as avaliações realizadas estão descritos a seguir.

3.1 Desenvolvimento da progênie

O desenvolvimento ponderal, físico e de reflexos foi verificado na prole de fêmeas tratadas com boldina e com controle durante o período gestacional (GD1 ao dia anterior ao parto).

3.1.1 Desenvolvimento ponderal

Os resultados de evolução da massa corporal da prole demonstram que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em que a progenitora foi tratada com boldina e o grupo controle ($P > 0,05$, Figura 1).

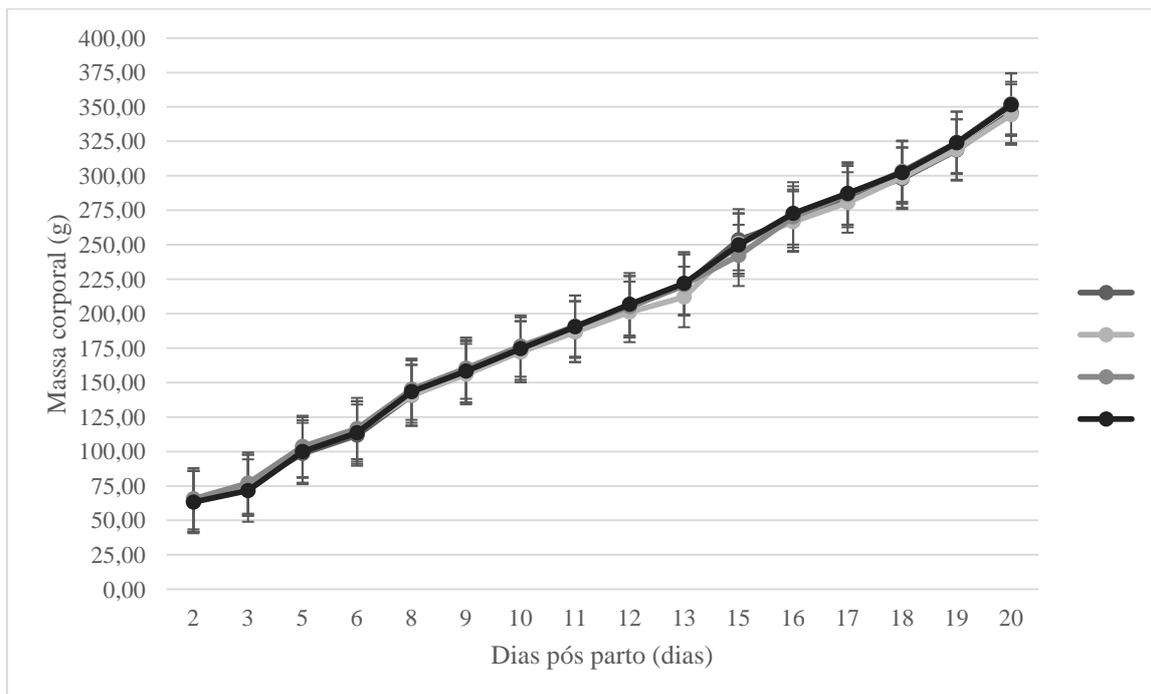


Figura 1. Evolução da massa corporal (g) da progênie exposta a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação. Dados expressos em média (n=20) ± EPM.

3.1.2 Desenvolvimento geral e sexual da progênie

Houve diferença estatisticamente significativa para o dia da manifestação das características físicas e sexuais ($P < 0,05$, Tabela 1). A abertura de olhos, característica física, apresentou alteração entre os grupos 1 mg/kg e 100 mg/kg, sendo o grupo que foi exposto a dose de 100 mg/kg o que teve abertura mais. A separação prepucial dos machos de fêmeas tratadas com a dose de 100 mg/kg de boldina ocorreu de forma precoce quando comparada com os demais grupos ($P < 0,05$). A descida de testículos mostrou desenvolvimento mais precoce nos grupos expostos a 10 mg/kg e 100 mg/kg de

boldina quando comparado com o grupo exposto a 1 mg/kg ($P < 0,05$). Em relação a abertura vaginal o grupo exposto a 100 mg/kg teve essa característica sexual desenvolvida mais precocemente quando comparada com o grupo exposto a 1 mg/kg ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Tempo médio (dias) para o aparecimento das características de desenvolvimento geral e sexual da progênie exposta a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação. Dados expressos em dias médios \pm EPM e limites inferior e superior. ($n = 152, 153, 139, 151$ respectivamente para ninhadas e 69, 63, 71, 68 para machos respectivamente e 75, 79, 66, 82 para fêmeas respectivamente).

Características	GRUPOS			
	CN	1BD	10BD	100BD
Descolamento de orelhas (2 – 4)	2 \pm 0,01	2 \pm 0,002	2 \pm 0,01	2 \pm 0,01
Aparecimento da penugem (5 – 6)	5	5	5	5
Aparecimento de pelos (8 – 10)	8	8	8	8
Erupção de incisivos (8 – 13)	11(10:11)	11(10:11)	11(10:11)	11(10:12)
Abertura dos olhos (12 – 16)	14(13:14)	14(14:14)	14(13:14)	14(13:14)*
Descida dos testículos (14 – 21)	15(15:16)	15(15:16)	15(15:15)*	15(14:16)*
Separação prepucial (29 – 48)	35(32:40)	37(35:40)	36(34,5:39)	35(31,75:35) *
Abertura do canal vaginal (29 – 48)	35(34:36,5)	36(34:37,5)	36(34:37)	35(33:37)*

* Diferença significativa ($P < 0,05$). Os dados são expressos em mediana e intervalos interquartis (25/75%) para Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn ou média \pm EPM para ANOVA seguido de teste de Turkey.

3.1.3 Desenvolvimento dos reflexos

Os seguintes reflexos da ninhada foram avaliados pois são indicadores sensíveis dos primeiros estágios do desenvolvimento do neonato (WHISHAW; KOLB, 2005).

3.1.3.1 Reflexo de Endireitamento

A figura 2 mostra as diferenças encontradas na avaliação do endireitamento em superfície da progênie exposta durante a gestação a diferentes concentrações da boldina que foi avaliada nos dias PPD2, 3 4 e 5. No PPD3 o grupo tratado com 10 mg/kg é estatisticamente diferente do grupo tratado com 100 mg/kg (∩). Já no PPD5 a ninhada de fêmeas expostas à boldina na dose de 100 mg/kg é significativamente diferente do grupo controle e do grupo tratado com 1 mg/kg (*) (†) ($P < 0,05$).

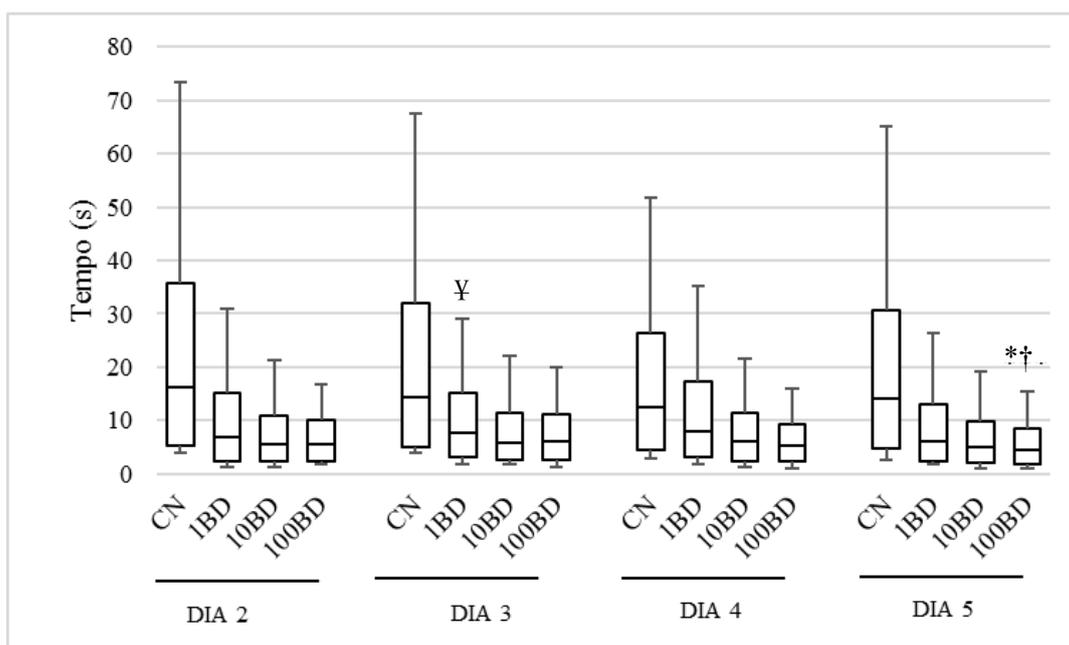


Figura 2. Característica de desenvolvimento comportamental (Endireitamento em Superfície) (segundos) da progênie exposta a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação, nos dias pós-natal 2, 3, 4 e 5. Os dados são expressos em mediana e intervalos interquartis (25/75%). * Diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo exposto ao controle † Diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo exposto a 1 mg.kg⁻¹ de boldina, ∩ Diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo exposto a 10 mg.kg⁻¹ de boldina, Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn ($n=152, 153, 139, 151$ respectivamente).

3.1.3.2 Reflexo de geotaxia

A geotaxia negativa foi avaliada nos PPD 7, 8, 9 e 10, demonstrando diferença estatisticamente significativa no PPD7 entre o grupo controle e o grupo em que as fêmeas foram expostas a boldina nas doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg ($P < 0,05$), também foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando comparados o grupo de filhotes cujas mães foram tratadas com 1 mg/kg e 100 mg/kg ($P < 0,05$) (Figura 3). Nos PPD8 e PPD9 foi encontrada apenas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo de exposição à boldina na dose de 1 mg/kg ($P < 0,05$). No PPD10 não houve diferença significativa entre os grupos de exposição à boldina ou a controle.

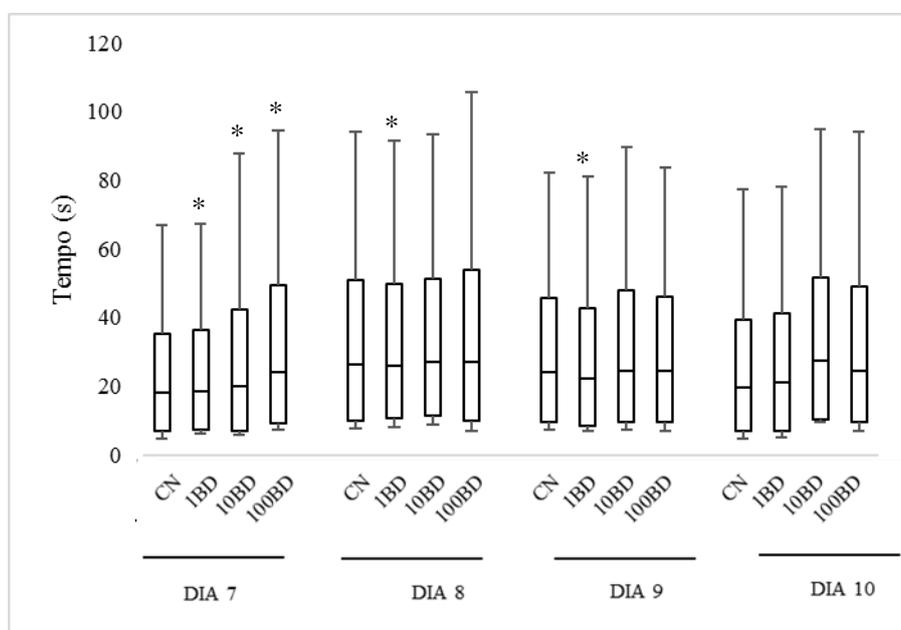


Figura 3. Característica de desenvolvimento comportamental (Geotaxia Negativa) (segundos) da progênie exposta a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação, nos dias pós-natal 7, 8, 9 e 10. Os dados são expressos em mediana e intervalos interquartís (25/75%). * Diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle, † diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo exposto a 1 mg.kg⁻¹ de boldina, Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn ($n=152, 153, 139, 151$ respectivamente).

3.1.3.3 Reflexo de Agarrar

Na resposta de agarrar da ninhada exposta a boldina por tratamento da fêmea durante a gestação teve alteração significativa apenas quando comparado o grupo controle com o grupo exposto a 100 mg/kg no PPD17 ($P < 0,05$, Figura 4)

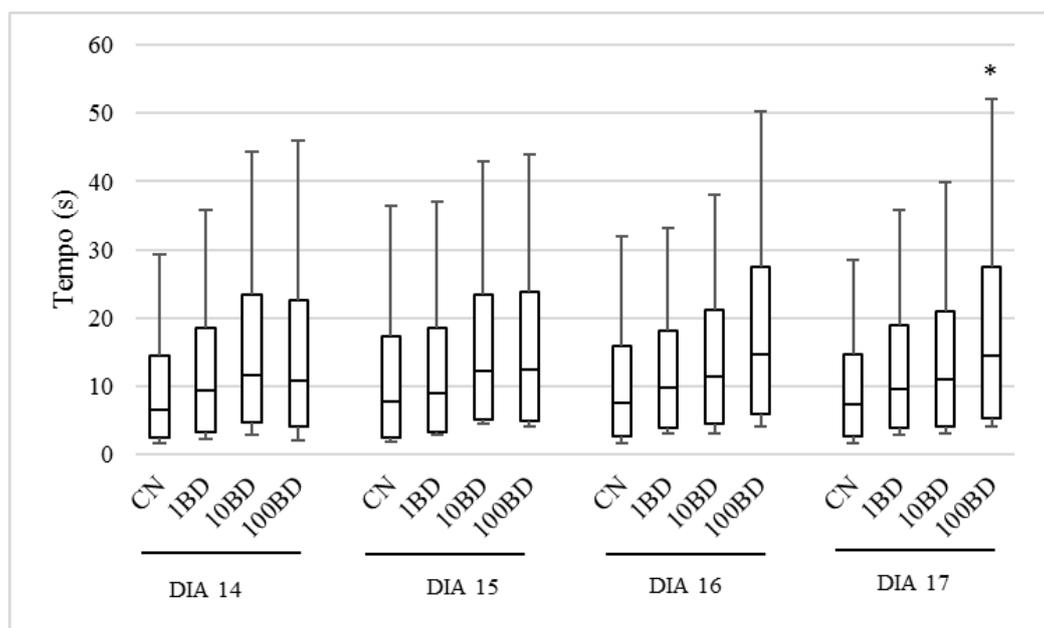


Figura 4. Característica de desenvolvimento comportamental (Resposta de Agarrar) (segundos) da progênie exposta a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação nos dias pós-natal 14, 15, 16 e 17. Os dados são expressos em mediana e intervalos interquartis (25/75%). * Diferença significativa (P < 0,05), Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn (n= 152, 153, 139, 151).

3.2 Comportamento em Campo aberto (*open field*)

Não houve alterações nas variáveis comportamentais observadas no teste de comportamento em campo aberto de forma significativa entre os grupos tratados e o controle (P > 0,05) (Tabela 2).

Tabela 2. Comportamento em campo aberto de machos cujas progenitoras foram expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação. Os dados são expressos em mediana e intervalos interquartis (25/75%). (n=8/grupo).

Comportamento	Grupos			
	CN	1BD	10BD	100BD
Latência (s)	16,0(9,5:19,7)	7,3(5,5:14,5)	12,2(11,3:21,4)	11,0(7,2:13,7)
Frequência de entrada no centro	12,0(9,25:17,5)	9,5(4,25:13,25)	20(17,2:34,7)	16,5(11,2:22,2)
Frequência de entrada na periferia	80,0(73,5:85,7)	73,0(51,7:113,5)	80,5(71,0:89,7)	67,5(60,75:89,75)
Rearing	24,5(18,0:31,5)	19,0(13,7:23,7)	20,5(14,0:27,75)	25,5(18,0:32,0)
Grooming	0,5(0:1)	0(0:1)	1(1:1)	0(0:1)
Bolos fecais	0	3(0,5:3)	0(0:0,75)	0(0:3,75)

Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn (P>0,05).

3.3 Peso de órgãos

Em relação a pesagem dos órgãos no PPD65 houve diferença significativa para o rim esquerdo de machos expostos a 100 mg/kg de boldina durante o período gestacional quando comparados com o controle, além disso a próstata de machos tratados na dose de 100 mg/kg foi estatisticamente diferente da dose de 10 mg/kg (Tabela 3) ($p < 0,05$).

Tabela 3. Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos púberes expostos a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação. Os dados são média ± EPM. (n=20/grupo).

Peso relativo	Grupos				
	%	CN	1BD	10BD	100BD
Baço		0,33±0,01	0,30±0,01	0,30±0,01	0,49±0,18
Coração		0,33±0,01	0,31±0,006	0,30±0,006	0,32±0,008
Fígado		4,53±0,12	4,30±0,09	4,36±0,07	4,23±0,09
Rim direito		0,41±0,01	0,39±0,009	0,39±0,005	0,42±0,01
Rim esquerdo		0,39±0,01	0,36±0,007	0,38±0,006	0,40±0,009*
Testículo		0,49±0,03	0,51±0,01	0,46±0,02	0,50±0,02
direito					
Testículo		0,50±0,03	0,51±0,01	0,49±0,01	0,50±0,02
esquerdo					
Epidídimo		0,10±0,004	0,11±0,004	0,10±0,003	0,11±0,005
direito					
Epidídimo		0,09±0,007	0,11±0,003	0,10±0,004	0,11±0,007
esquerdo					
Próstata		0,07±0,005	0,07±0,006	0,06±0,004	0,09±0,007‡
Vesícula		0,13±0,009	0,12±0,008	0,09±0,01	0,13±0,01

seminal

ANOVA * ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle e ‡ ($P < 0,05$) em relação ao grupo exposto a 10 mg.kg⁻¹ de boldina.

Já em relação ao peso dos órgãos das fêmeas da ninhada, ocorreu diferença estatística no fígado e o rim esquerdo ($P < 0,05$) das fêmeas expostas a boldina na dose de 100 mg/kg quando comparado com o controle e ao grupo tratado com 1 mg/kg, sendo esse apresentado aumentado; o ovário direito apresentou-se diferente

estatisticamente quando comparamos o grupo exposto a 1 mg/kg de boldina com o controle e o grupo exposto a 10 mg/kg, que também foi diferente no ovário esquerdo ($P < 0,05$). Em relação ao útero das fêmeas púberes, este está aumentado no grupo exposto a 100 mg/kg pelo tratamento da mãe com boldina em relação as doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg ($P < 0,05$) (Tabela 4). Os demais órgãos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em ambos os sexos ($P > 0,05$).

Tabela 4. Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas púberes expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante gestação. Os dados são média ± EPM. (n=20/grupo).

Peso relativo %	Grupos			
	CN	1B	10BD	100BD
Baço	0,32±0,01	0,34±0,01	0,34±0,14	0,30±0,01
Coração	0,31±0,01	0,31±0,005	0,3±0,005	0,33±0,008
Fígado	3,90±0,19	3,99±0,08	4,13±0,16	4,56±0,19*
Rim direito	0,36±0,02	0,37±0,007	0,37±0,007	0,42±0,02
Rim esquerdo	0,34 ±0,02	0,36±0,009	0,36±0,008	0,41±0,01*†
Ovário direito	0,02 ±0,001	0,03±0,001*‡	0,02±0,001	0,02±0,001
Ovário Esquerdo	0,02 ±0,012	0,02±0,001*‡	0,02±0,001	0,02±0,001
Útero	0,14 ±0,011	0,13±0,006	0,14±0,008	0,18±0,01‡‡

ANOVA * ($P < 0,05$) em relação ao grupo exposto ao controle, † ($P < 0,05$) em relação ao grupo exposto a 1 mg.kg⁻¹ de boldina e ‡ ($P < 0,05$) em relação ao grupo exposto a 10 mg.kg⁻¹ de boldina.

3.4 Análise Histológica

As ninhadas as quais as progenitoras foram expostas durante o período gestacional a boldina não apresentaram sinais de hepatotoxicidade na análise histológica, tampouco qualquer outra alteração para os outros órgãos avaliados.

3.5 Índices de fertilidade de machos púberes

A exposição de machos durante o período gestacional a boldina causou aumento na produção diária de espermatozoides na dose de 10mg/kg em comparação com todas

as demais doses, mas apenas significativa quando comparada com a dose de 100 mg/kg e a dose de 100 mg/kg apresenta-se reduzida quando comparada com a dose de 1 mg/kg ($P < 0,05$)(Tabela 5). Apesar da diferença na produção de espermatozoides nos testículos, não ocorreu alteração significativa no número de espermatozoides encontrados no epidídimo. Em relação a presença de espermatozoides anormais foi encontrada diferença estatisticamente significativa na comparação entre o grupo exposto a 100 mg/kg em relação ao de 1 mg/kg de boldina, apresentando maior número de espermatozoides anormais.

Tabela 5. Índices de fertilidade dos machos púberes expostos a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação. Os dados são média \pm EPM ou percentual. ($n=20$ /grupo).

	Grupos			
	CN	1BD	10BD	100BD
Produção diária espermatozoides (x 10 ⁵)	5,24(3,10:0,83)	4,87(3,38:9,44)	7,13(4,19:11,58) ^x	2,01(1,17:4,45) [†]
Número espermatozoides (x 10 ⁶)	2,43(1,44:3,89)	2,43(1,37:4,53)	2,40(1,68:3,46)	2,34(1,36:5,76)
Espermatozoides anormais (%)	12(10:18)	12(7:18,5)	18(13,5:20,5)	21(16:28) [†]

[†] Diferença significativa ($P < 0,05$) em relação a grupo exposto a 1 mg.kg⁻¹ de boldina, ^x diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo exposto a 100 mg.kg⁻¹ de boldina. Os dados são expressos em mediana e intervalos interquartis (25/75%) ($n= 20$). Teste Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas ($P < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

A avaliação do peso dos animais é utilizada como parâmetro para indicar o estado de saúde e desenvolvimento, bem como, pode fornecer informação importante sobre a toxicidade (HOLLENBACH *et al.*; 2015) e em relação a essa avaliação não foi encontrada diferença significativa entre os animais expostos pelo tratamento das fêmeas durante o período gestacional nos diferentes grupos.

As características físicas e sexuais da prole foram alteradas pela administração da boldina de forma diversificada nos grupos expostos. O tratamento com boldina acarretou em desenvolvimento precoce dos testículos, separação precoce do prepúcio e abertura antecipada do canal vaginal, além da abertura precoce dos olhos. Essas alterações podem ter um efeito no desempenho sexual da prole (DANTAS, 2016), que será investigada em estudos posteriores.

A exposição maternal à xenobióticos durante a gestação e lactação podem causar neurotoxicidade no desenvolvimento e/ou anormalidades comportamentais nos descendentes (CASTRO; PALERMO-NETO, 1988; CASTRO *et al.*, 1992). Segundo os mesmos autores, as avaliações comportamentais são capazes de demonstrar, até mesmo na vida adulta do animal, se a exposição maternal causou alterações no sistema nervoso. Foi realizada a observação dos reflexos (reflexo postural, teste de endireitamento, geotaxia negativa e força de agarrar), pois são indicadores sensíveis dos primeiros estágios do desenvolvimento do neonato (WHISHAW; KOLB, 2005).

O reflexo medular postural está parcialmente integrado à medula e os animais devem apresentar logo ao nascimento, e a substância cinzenta da medula é uma zona de integração para os reflexos medulares e outras funções motoras (WHISHAW; KOLB, 2005). Em nosso estudo, no segundo e terceiro dias de realização dessa avaliação não ocorreu diferença significativa entre os grupos, entretanto no grupo exposto a dose de 10 mg/kg de boldina apresentou menor tempo para o reflexo de endireitamento no primeiro dia e o grupo exposto a 100 mg/kg apresentou menor tempo para voltar a postura quadrúpede no último dia de avaliação, demonstrando assim, uma melhora no controle motor fino nos primeiros dias de vida.

O reflexo de geotaxia refere-se a resposta de orientação e a movimentos expressos em oposição às pistas dos vetores gravitacionais (MOTZ; ALBERTS, 2005), diagnosticando problemas na função vestibular e/ou proprioceptiva do animais. Sobre esse reflexo podemos perceber que a boldina atrasou-o no primeiro dia da avaliação em todas as doses de exposição à boldina, mas essa alteração só se manteve nos próximos dias de avaliação no grupo tratado com a menor dose, e no último dia de avaliação pode-se perceber ainda que os animais demoraram mais tempo para terminar o exercício, entretanto não foi significativo; demonstrando que as alterações causadas foram reversíveis.

A força de agarrar geralmente é utilizada para fins de complementar os testes de função motora, podendo demonstrar diferenças na capacidade motora desses animais e

ainda no SNC, já que estes podem desistir mais rapidamente de permanecerem agarrados; nesse teste apenas a dose de exposição de 100 mg/kg apresentou diferença significativa, mas apenas no último dia de avaliação, indicando que esse grupo ficou mais tempo agarrado, que pode ser um indicador de maior força muscular ou ainda como uma ação direta no SNC de forma que esses animais não desistem de se agarrar como os demais grupos.

Esses resultados nos levam a sugerir que a boldina quando administrada no período gestacional interfere nos reflexos nos filhotes nos primeiros dias de vida. As alterações comportamentais provenientes do tratamento com a boldina podem estar ligadas a sua ação no SNC como anti e pró-oxidante dependendo da dose, ou ainda devido a sua ação em diferentes receptores, como sua ação como antagonista dopaminérgico, que tem sido relacionada a alterações em diversos comportamentos e enzimas neurais (O'BRIEN *et al.*, 2016).

Ao nascerem, os mamíferos não estão com o sistema nervoso plenamente desenvolvido. Nos ratos, o sistema nervoso está suscetível a alterações ambientais logo após o nascimento. O desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse pode ser modificado por eventos que ocorrem durante este período (MEANEY *et al.*, 1993). Diferenças no comportamento materno como causadas pela boldina podem causar alterações no comportamento da prole e em seu desenvolvimento.

Em relação ao teste de campo aberto, não foram encontradas diferenças significativas entre os animais expostos aos diferentes grupos; indicando que apesar da boldina causar alterações em reflexos de ratos nos primeiros dias de vida essas alterações não são encontradas em ratos adultos.

A análise dos pesos dos animais revelou alteração no peso de órgãos como rim e fígado de machos e fêmeas dos grupos expostos a boldina, assim como os órgãos reprodutivos, próstata nos machos e ovários nas fêmeas.

A avaliação da morfologia e produção de espermatozoides gerados na prole de fêmeas tratadas durante o período gestacional apresentou alterações significativas no grupo exposto a maior dose de boldina; indicando que o tratamento das fêmeas gera alterações reprodutivas na prole pública. Para verificar a possível causa dessa alteração será necessária a realização de estudos futuros.

5 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo trazem informações suficientes para inferirmos que a boldina quando administrado a fêmeas durante o período gestacional interfere no desenvolvimento da prole (abertura precoce dos olhos, descida precoce dos testículos, abertura vaginal precoce e ainda a separação prepucial precoce), cognitivas e comportamentais (testes de reflexos). Todavia no comportamento da prole de fêmeas expostas à boldina, na puberdade, não é alterado (teste em campo aberto), pode-se concluir, então, que as alterações no desenvolvimento da prole e características físicas e sexuais não alteram o comportamento da prole na vida adulta no que se refere ao comportamento em campo aberto. Entretanto, as alterações em variáveis reprodutivas podem ser permanentes já que ocorreu diferença na pesagem de órgãos, na produção de espermatozoides e no número de espermatozoides anormais encontrados.

Com esses achados conclui-se que o alcaloide boldina e por consequência o chá de *P. boldus* (que contém esse alcaloide), devem ser evitados durante o período gestacional, por seus efeitos nocivos à fêmea e ao desenvolvimento da prole.

REFERÊNCIAS

- ABEL, E.L.; DINTCHEFF, B.A. Effects of Prenatal Alcohol Expure on Growth and Development in Rats. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.207, n.3, p.916-321, 1978.
- ASANO, Y. Characteristics of open field behavior of Wistar and Sprague-Dawley rats. **Experimental Animals**. v.35, n.4, p. 505-508, 1986.
- CASTRO, V.L. **Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-Filhote Expostos a Agroquímicos**. Circular técnica 13, Embrapa Meio ambiente, Jaguariúna, SP. 2006.
- CASTRO, V.L.; BERNARDI, M.M.; PALERO-NETO, J. Evaluation of prenatal aldrin intoxication in rats. **Archives of Toxicology**. v.66, p.149-152, 1992.
- CASTRO, V.L.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**. v.111, n.1-2, p.93-102, 2000.
- CASTRO, V.L.; PALERMO-NETO, J. Alterations in the behavior of young and adult rats exposed to aldrin during lactation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.21, p. 987-990, 1988.
- COSTA, L.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v.44, p.87-110, 2004.
- COSTA, P.A.; POLI, J.H.Z.; SPEROTTO, N.D.M.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; NIN, M.S.; BARROS, H.M.T. Brain DNA damage and behavioral changes after repeated intermittent acute ethanol withdrawal by young rats. **Psychopharmacology**. v. 232, p.3623-3636, 2015.

DANTAS, A.S. **Estudo de toxicidade reprodutiva e genotoxicidade do óleo essencial de *Origanum majorana***. Porto Alegre, 119p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2016.

EPA – Environmental Protection Agency. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**. Federal Register v.61, n.212, p.56274-56322, october, 1996.

ESCOPE. MONOGRAPHS on the medicinal uses of plant drugs. **European Scientific Cooperative on Phytotherapy – ESCOP**, 1997.

GIOVANA, B. **Marcadores de desenvolvimento em filhotes de ratas expostas ao álcool no período pré-natal**. Porto Alegre, 104p. Tese (Mestrado em Neurociências) – Programa de Pós-graduação em Neurociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2009.

GOTTELAND, M.J. et al. Effect of a dry boldo extract on oro-cecal intestinal transit in healthy volunteers, **Rev. Med. Chil.** 123 (1995) 955–960.

HOLLEMBACH, C.B.; BING, R.S.; STEDILE, R.; MELLO, F.B.S.; SCHUCH, T.L.; RODRIGUES, M.R.A.; MELLO, F.B.; MELLO, J.R.B. Reproductive toxicity assessment of *Origanum vulgare* essential oil on male Wistar rats. **Acta Scientiae Veterinariae.** v.43, p. 1295-1301, 2015.

KORENBROT, C.C.; HUHTANIEMI, I.T.; WEINER, R.I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. **Biol Reprod.** v.17, p.298-303, 1977.

MEANEY, M. J.; BHATNAGAR, S.; LAROCQUE, C. K.; MCCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V.; PLOTSKY, P. M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Annals New York Academy of Science**, 697:70-85, 1993.

MELLO, JRB; LANGELOH, A.; HABERMEHL, G.; KREBS, H.; BASTOS, F.; ALVARES, F. Efeitos de extratos de *Nierembergia veitchii* (Hook) Solanaceae sobre a fertilidade de ratas e morfologia óssea dos fetos. **Ciência Rural.** v.30, n.3, p.411-415, 2000.

MENGUE, S.S.; SCHENKEL, E.P.; MENTZ, L.A.; SCHMIDT, M.I. Especies vegetales utilizadas por embarazadas con el objeto de provocar la menstruación (Encuesta a siete ciudades de Brasil). **Acta Farmacéutica Bonaerense.** v.16, n.2, p.251-8, 1997.

MOTZ, B. A.; ALBETS, J. R. The validity and utility of geotaxis in Young rodents. **Neurotoxicology and Teratology.** v. 27, p. 529-533, 2005.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, n. 1, p. 1-17, 2006.

OECD Guideline for the Testing of Chemicals 416, **Two Generation Reproduction Toxicity Study**, 2001b.

PIFFER, R.C.; GARCIA, P.C.; GERARDIN, D.C.; KEMPINAS, W.G.; PEREIRA, O.C. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. **Reprod. Fertil. Dev.** v.21, p.634-639, 2009.

QUEZADA, M.; ASENSIO M.; DEL VALLE J.M.; AGUILERA J.M.; GÓMEZ B. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves, **J. Food Sci.** v.69, p.371–376, 2004.

RICE, D.; BARONE JÚNIOR., S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives Supplements**, Triangle, v.108, n.3, p.511-533, 2000.

ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adults rats. **J. Reprod. Fert.** v.54, p.103-107, 1978.

SPETHMANN, C.N. **Medicina Alternativa de A a Z**. Ed. Natureza. 2003.

WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. **The behavior of the laboratory rat**. Oxford: Oxford University press. 2005.

WHO. **Organización Mundial de la Salud Ginebra**. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. 2005.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: A risk of assessment approach. In. **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1989.

4.2 ARTIGO 2 – BOLDINE ALTERA DESEMPENHO REPRODUTIVO DE RATAS WISTAR

RESUMO

A boldina é o principal alcaloide encontrado em *Peumus boldus*, muito utilizado na medicina tradicional principalmente pelos seus efeitos gastrointestinais e hepáticos; e por gestantes para aliviar os efeitos negativos da gestação como, constipação, cólicas uterinas, cefaleia e náuseas; paradoxalmente, é utilizado também como substância abortiva. Diversos estudos verificaram sua ação em diversos sistemas por seu alto potencial antioxidante e atualmente sabe-se que ele apresenta diversas atividades farmacológicas como colegoga, hipnótica, citoprotetora, antitumoral, anti-inflamatória, antipirética, antiplaquetária, antiplasmódica, antidiabética, anti-hipertensiva, inibidora da tirosinase e da acetilcolinesterase, antagonista dopaminérgico (receptores D1 e D2 *like*), adrenérgico (receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$) e serotoninérgico (receptores 5-HT3). Este estudo procurou identificar qual sua ação em ratas *Wistar* tratadas durante o período gestacional, dia gestacional 1 (GD1) ao dia anterior ao parto, nas doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg, uma vez ao dia, no ciclo claro, por meio de gavagem. Foram encontradas perdas pré e pós implantação, mortes ao nascimento e pós-natais, alteração na taxa de gestação e fertilidade; e ainda alterações no comportamento materno (latência para lambar) provavelmente devido a sua ação como antagonista dopaminérgico. O uso da boldina e do chá de *P. boldus*, portanto, deve ser evitado durante o período gestacional.

Palavras-chave: toxicidade reprotiva, boldine, *Peumus boldus*, toxicidade, reprodução, substâncias abortivas

ABSTRACT

The boldine is the main alkaloid found in Peumus boldus, widely used in traditional medicine mainly for its gastrointestinal and hepatic effects; and by pregnant women to alleviate the negative effects of pregnancy, such as constipation, uterine cramps, headache and nausea; paradoxically, it is also used as an abortive substance. Several studies have verified its action in several systems because of its high antioxidant potential; currently its known that it presents several pharmacological activities such as colegoga, hypnotic, cytoprotective, antitumoral, anti-inflammatory, antipyretic, antiplatelet, antiplasmodic, antidiabetic, antihypertensive, dopaminergic antagonist (D1 and D2-like), adrenergic antagonist ($\alpha 1$ and $\alpha 2$ receptors), and serotoninergic antagonist (5-HT3 receptors). This study aimed to identify the effect of boldine in Wistar rats treated during the gestational period, gestational day 1 (GD1) to the day before delivery, at doses of 1mg/kg, 10mg/kg and 100mg kg of boldine, daily, light cycle, by means of an orogastric tube. It was found pre and post implantation losts, deaths at birth and postnatal deaths, alteration in pregnancy rate and fertility. Besides, boldine changes maternal behavior (pup licking), probably due to its action as a dopaminergic antagonist. The use of boldine and Peumus boldus tea, therefore, should be avoided during the gestational period.

Key words: reprotoxic toxicity, boldine, Peumus boldus, toxicity, reproduction, abortifacient substances

1 INTRODUÇÃO

Boldina é o principal alcaloide encontrado em *Peumus boldus*, sendo utilizado na medicina tradicional principalmente pelos seus efeitos gastrointestinais e hepáticos. Estudos indicam diversificadas atividades farmacológicas como como colegoga, hipnótica, citoprotetora, antitumoral, anti-inflamatória, antipirética, antiplaquetária, antiplasmódica, antidiabética, anti-hipertensiva, inibição da tirosinase e da acetilcolinesterase, e antagonista dopaminérgico (receptores D1 e D2 *like*), adrenérgico (receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$) e serotoninérgico (receptores 5-HT₃), entre outras (O'BRIEN *et al.*, 2006).

O uso de plantas medicinais é vastamente difundido por todo o mundo e pouco é informado aos profissionais da área da saúde pela população sobre a utilização destes recursos (INFARMA, 2007) ou ainda a população sobre sua toxicidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que o uso de plantas medicinais tem grande importância, sugerindo ser uma alternativa viável e importante às populações dos países em desenvolvimento, já que seu custo é diminuído e conclui que, no mundo, 80% das pessoas dependem da medicina tradicional para suas necessidades de cuidados primários de saúde (WHO, 2005). O chá de boldo (*Peumus boldus*) é utilizado por gestantes para aliviar os efeitos negativos da gestação como, constipação, cólicas uterinas, cefaleia e náuseas; controverso a esse uso ele também é muito utilizado para fins abortivos (MENGUE *et al.*, 1997). Extensas pesquisas delinearão os circuitos neurais básicos que medeiam a expressão do comportamento maternal e a visão atual é que os sistemas de dopamina (DA) mesolímbica e mesocorticais fazem parte de um sistema motivacional não específico ou geral, que serve para aumentar a capacidade de resposta de um organismo a uma vasta variedade de estímulos biologicamente significativos, incluindo os filhotes (CHEN *et al.*, 2014), e que a DA está envolvida em ambas fases de regulação do comportamento (BRIDGES, 1996). Como a boldina é um bloqueador dos receptores dopaminérgicos (ZETHER, 1988; ASECIO, 1999), seu uso crônico pode causar alterações no comportamento materno, já que poderia ter ação na via dopaminérgica.

Portanto, é muito importante a verificação da toxicidade do alcaloide boldina durante o período gestacional. Este estudo procurou identificar qual seu efeito em ratas *Wistar* tratadas durante o período gestacional (dia gestacional 1 ao parto) nas doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg de boldina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e tratamentos

Foi utilizada Boldina, adquirida da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Brasil Ltda).

Foram utilizados 30 machos e 95 fêmeas nulíparas, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), acasalados em uma proporção de três fêmeas para cada macho. O início da gestação (GD0) foi constatado através de esfregaço vaginal contendo espermatozoides. A boldina foi administrada nas fêmeas prenhas uma vez ao dia, via oral (gavagem) em um volume de 1 ml/100g de peso corporal a partir do dia 1 da gestação (GD1) até o dia do parto. A toxicidade foi avaliada utilizando-se três doses espaçadas geometricamente, conforme recomendado por ANVISA, OECD, FDA, sendo a menor dose 0,001g%, a dose que contém a quantidade de boldina presente em 40g de folhas de *Peumus boldus*, quantidade recomendada para tratamento de náuseas (SPETHMANN, 2003). Estima-se que as folhas de *Peumus boldus* contenham aproximadamente 0,14% de boldina (QUEZADA *et al.*, 2004; GOTTELAND *et al.*, 2004). Este valor também está dentro da margem de uso recomendada pela ESCOP para disfunções hepatobiliares leves e distúrbios gastrointestinais (ESCOP, 1997). Com base nessas informações foram propostas as seguintes doses de tratamento:

Grupo I – Controle negativo, descendentes de fêmeas tratadas com salina 0,9% (NaCl, 0,9%) (CN).

Grupo II – Dose 1 (1 mg.kg⁻¹), descendentes de fêmeas tratadas com boldina na concentração de 0,001g% (100BD).

Grupo III – Dose 2 (10 mg.kg⁻¹), descendentes de fêmeas tratadas com boldina na concentração de 0,01g% (10BD).

Grupo IV – Dose 3 (100 mg.kg⁻¹), descendentes de fêmeas tratadas com boldina na concentração de 0,1g% (100BD).

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em biotério sob condições constante de umidade (50% ± 5), temperatura (21°C ± 2), ciclo de luz

claro/escuro de 12h e alimentados com ração comercial (Nuvital CR 1, Nuvital, Colombo, PR) e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRGS, Porto Alegre, RS, número 29477.

2.2 Protocolos Experimentais

2.2.1 Parâmetros reprodutivos

Os indicadores reprodutivos avaliados nas fêmeas foram: número de fêmeas gestantes, número de filhotes nascidos vivos, número de filhotes nascidos, número de fêmeas copuladas que gestaram, número de filhotes por ninhada, massa corporal dos filhotes ao nascimento e proporção de machos e fêmeas nascidos. Com esses dados foram calculadas as taxas reprodutivas. Foi verificada a variação de peso das fêmeas durante o período gestacional e lactacional e peso relativo dos órgãos.

A partir dos dados obtidos, foram calculadas as taxas reprodutivas de acordo com *U.S. Environmental Protection Agency, USEPA (1996)*.

Os consumos de ração e água também foram mensurados diariamente para cada fêmea.

2.2.1.1 Taxas reprodutivas

Taxa de gestação = n° de fêmeas gestantes com filhotes / n° de fêmeas espermatozóide lavado vaginal x 100

Taxa de fertilidade = n° fêmeas que gestaram / n° fêmeas acasaladas x 100

Taxa de natalidade = n° filhotes nascidos vivos / n° de filhotes nascidos x 100

Taxa de gestações com perdas pós-implantação = gestações com perdas pós-implantação / n° total de gestações nascidos x 100

Taxa de gestações com filhotes mortos ao nascimento = n° gestações com filhotes nascidos mortos / n° fêmeas com filhotes nascidos nascidos x 100

Taxa de gestações com filhotes mortos após o nascimento = n° gestações com filhotes mortos após p nascimento/ n° fêmeas com filhotes nascidos nascidos x 100

2.2.2 Evolução da massa corporal gestacional e lactacional

Foi verificada a variação de peso das fêmeas no período gestacional (GD1 ao dia anterior ao parto) e no período lactacional (PPD1 ao PPD21).

2.2.3 Comportamento em campo aberto

No 15º dia gestacional (GD15), oito fêmeas de cada grupo tiveram seu comportamento testado através do teste de campo aberto com adaptações de Asano (1989). Cada fêmea foi colocada em uma arena quadrática de 1m² com paredes de 50 cm de altura e base dividida em quadrantes de 20 cm² perfazendo divisão de 25 quadrados. O comportamento do animal foi registrado em vídeo durante 5 minutos. O teste foi realizado durante o ciclo claro, pela manhã e foram analisadas as seguintes categorias comportamentais: latência para primeira entrada em quadrante lateral, frequência de entrada no centro, frequência de entrada na periferia, permanência sobre as duas patas traseiras (*rearing*), frequência de locomoção, autolimpeza (*grooming*) e quantidade de bolos fecais.

2.2.4 Comportamento materno

O comportamento materno foi avaliado com adaptações de Arrati e colaboradores (2006), Champagne e colaboradores (2003), Pereira e Ferreira (2006), Souza e colaboradores (2010) e Souza e colaboradores (2012) nos dia 1 pós-natal (PPD1), durante o ciclo claro pela manhã, antes de qualquer manipulação na mãe ou na prole. O comportamento foi realizado em duas fases: na primeira fase ocorre com uma filmagem da caixa moradia transparente sem qualquer manipulação para identificação da qualidade do ninho sem nenhuma intervenção, já na segunda fase a rata lactante é removida da sua caixa moradia e o ninho é desfeito. Os filhotes foram aleatoriamente distribuídos no lado oposto ao ninho desfeito e após a fêmea foi recolocada na caixa, na diagonal oposta aos filhotes. O comportamento foi filmado em câmera digital durante 20 minutos, e os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo da mãe envolvida em lambe os filhotes; tempo dispensado na construção do ninho; qualidade do ninho (escore de 0 a 3, onde 0 = ausência de ninho; 1 = ninho pobre no qual não foi usado todo o material disponível; 2 = ninho com paredes; 3 = ninho excelente com uso de todo

o material disponível) e tempo dispensado na amamentação e cuidados com a progênie e ainda o comportamento de busca dos filhotes.

2.2.5 Peso e Histologia dos órgãos

No PPD21, as fêmeas tratadas com boldina durante o período gestacional e controle negativo depois de eutanasiadas tiveram coletados seus rins, fígado, baço e coração, com vistas à avaliação de possíveis alterações macroscópicas. A massa de cada órgão foi mensurada e relacionada com a massa corporal do indivíduo. Dos órgãos sexuais femininos, passaram também pelo procedimento acima descrito os ovários e o útero. Todos os órgãos foram fixados em solução de formalina tamponada. Todos os órgãos foram examinados no Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

2.2.6 Análise dos testes de comportamento

Todos os testes de comportamento foram registrados usando câmera de vídeo digital e analisados através do *software* Behavsoft[®] (patente pendente). Este programa permite uma análise precisa do comportamento em tempos selecionados pelo usuário, através de uma única interface usando comandos de atalho do teclado (COSTA *et al.*, 2015).

2.2.7 Análise estatística

As variáveis em questão foram primeiramente submetidas a teste de normalidade (Shapiro-Wilk). A análise estatística incluiu a análise de variância de uma via (ANOVA), Kruskal-Wallis e qui-quadrado. As variáveis quantitativas seguiram o teste Kruskal-Wallis e as qualitativas qui-quadrado ou Kruskal-Wallis, seguidas de teste de Tukey para amostras paramétrica e teste de Dunn para as não paramétricas. Todas as análises foram executadas usando o GraphPad Prism 7. Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando o valor de P foi menor que 0,05. Os valores foram expressos como média e erro padrão da média (\pm EPM).

3 RESULTADOS

3.1 Desempenho reprodutivo

Houve diferença estatisticamente significativa nas taxas de fertilidade, gestação e de perdas pós-implantação ($P < 0,05$) conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Desempenho reprodutivo de fêmeas expostas à salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação. Dados expressos em média ± EPM ou percentual (n= 20).

Desempenho Reprodutivo	Grupos			
	CN	1BD	10BD	100BD
Número de filhotes / ninhada	11,73±0,09	10,71±0,16	9,90±0,19	10,33±0,18
Número de implantes / ninhada	12,21±1,65	11,57±3,15	11,53±2,80	11,71±3,47
Massa corporal da ninhada ao nascimento (g)	79,45±2,81	70,87±4,82	76,30±3,57	67,17±5,21
Proporção de sexo (macho:fêmea)	1,11:0,90	1,40:0,71	1:1	1,34:0,74
Taxa de gestação (%)	100	90,90	80*	83,33
Taxa de natalidade (%)	100	98,68	98,57	100
Taxa de fertilidade (%)	100	90,90	88,00	83,33*
Gestações perdadas pós-implantação (%)	20	60*	63*	75*
Gestações com filhotes mortos ao nascimento (%)	0	20	10	0
Gestações com filhotes mortos após o nascimento (%)	0	10	10	10

ANOVA ou Qui-quadrado * ($P < 0,05$).

Os consumos de ração e água também foram mensurados diariamente para cada fêmea e não ocorreram alterações significativas nos consumos durante o período gestacional e lactacional (Figuras 1A, 1B; 2A, 2B).

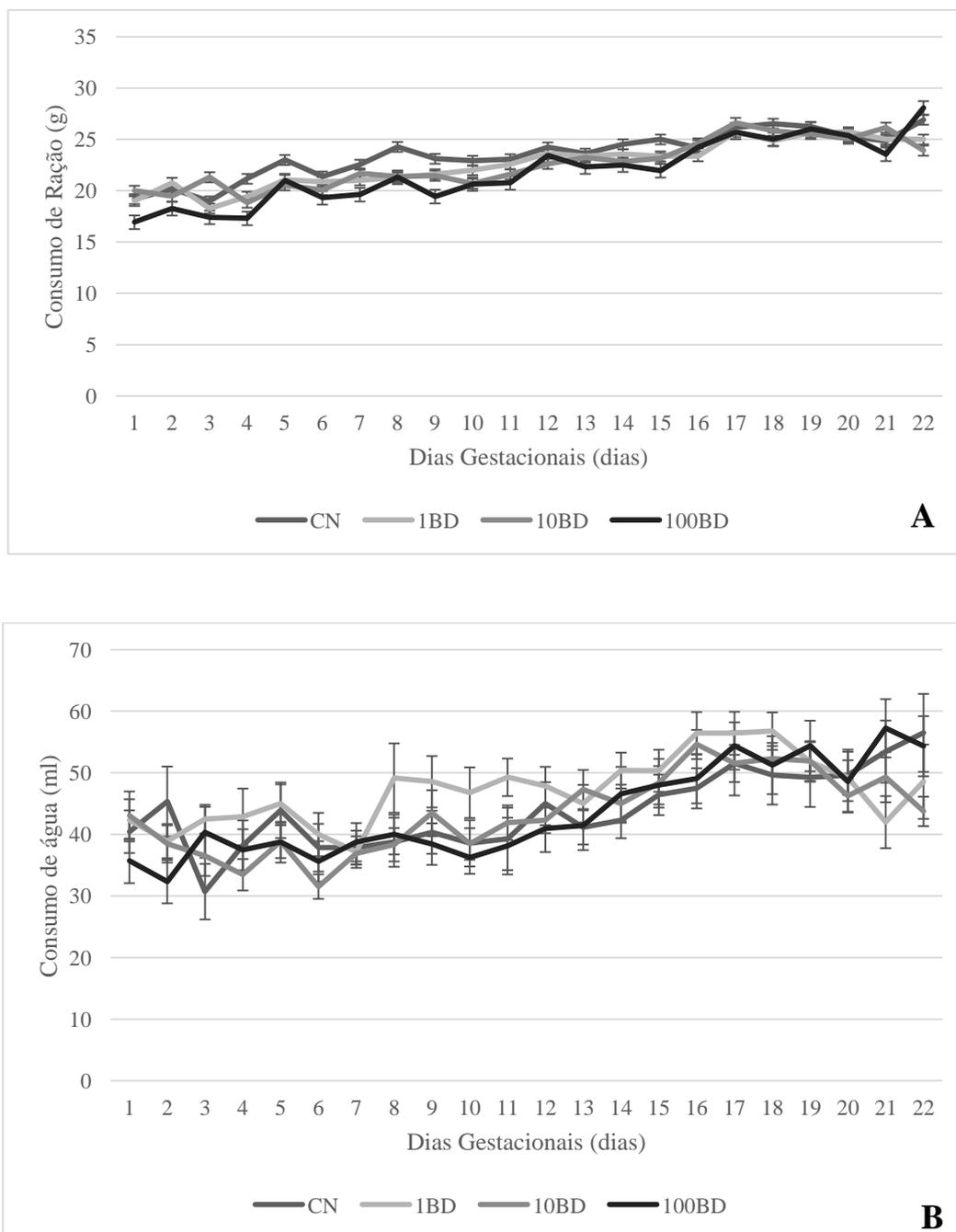


Figura 1. Consumo de ração (A) e água (B) de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação no período gestacional. Os dados são média ± EPM. P > 0,05 (ANOVA).

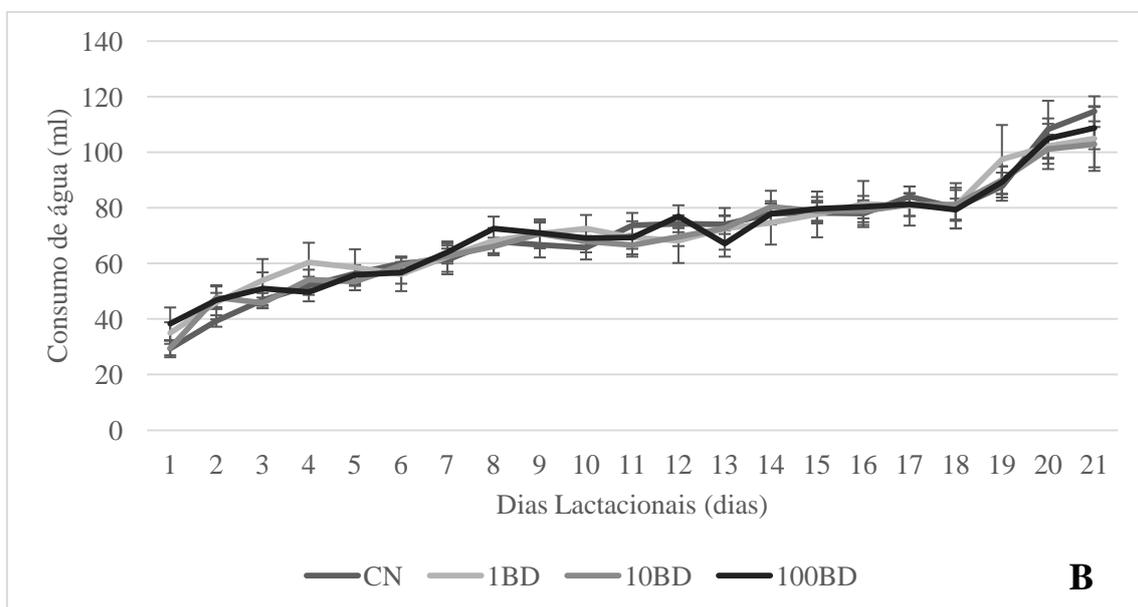
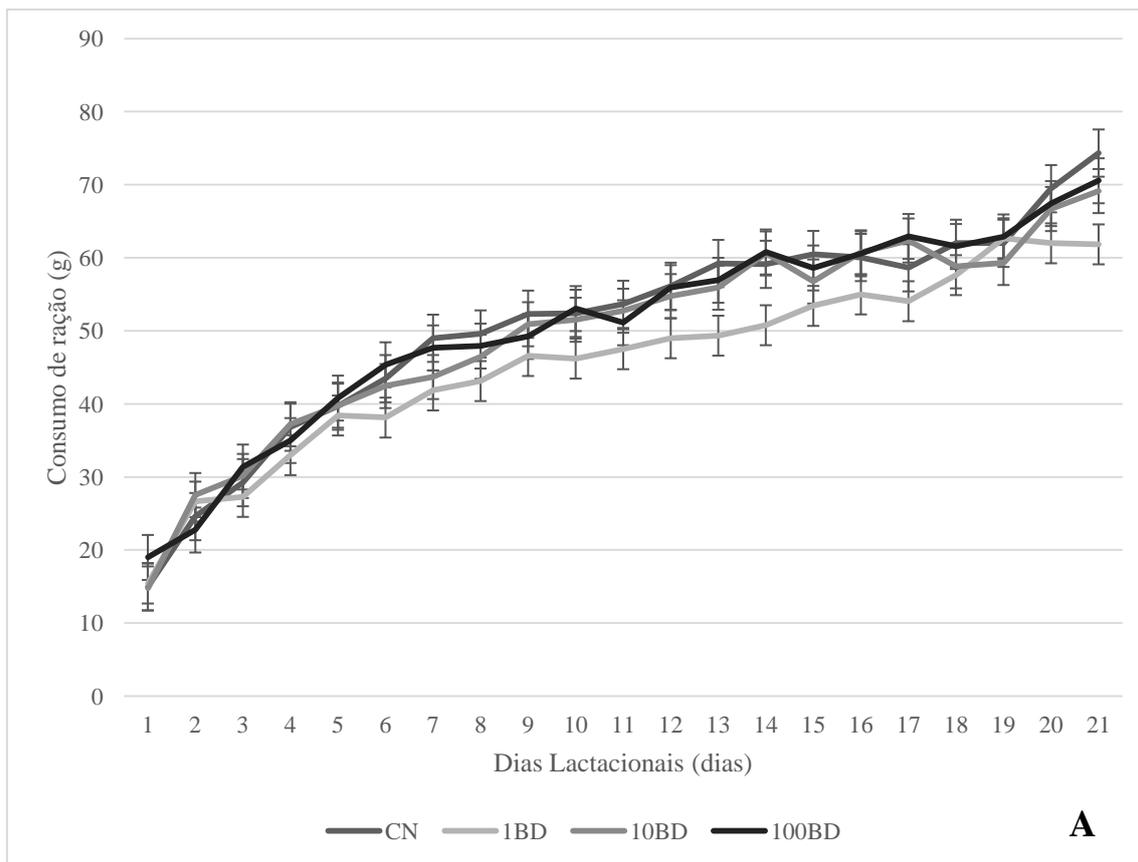


Figura 2. Consumo de ração (A) e água (B) de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação no período lactacional. Os dados são média ± EPM. P > 0,05 (ANOVA).

3.2 Evolução da massa corporal gestacional e lactacional

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a evolução da massa corporal durante o período gestacional e lactacional entre as fêmeas tratadas com boldina quando comparadas com o controle ($P > 0,05$, Figura 3 e 4).

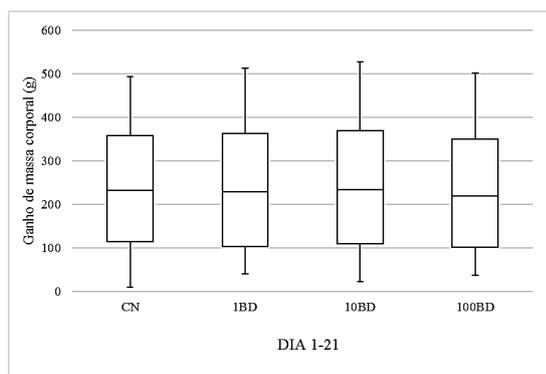


Figura 3. Evolução da massa corporal gestacional de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação. Os dados são expressos em mediana e intervalos interquartis (25/75%) (n= 20). Teste Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas ($P > 0,05$).

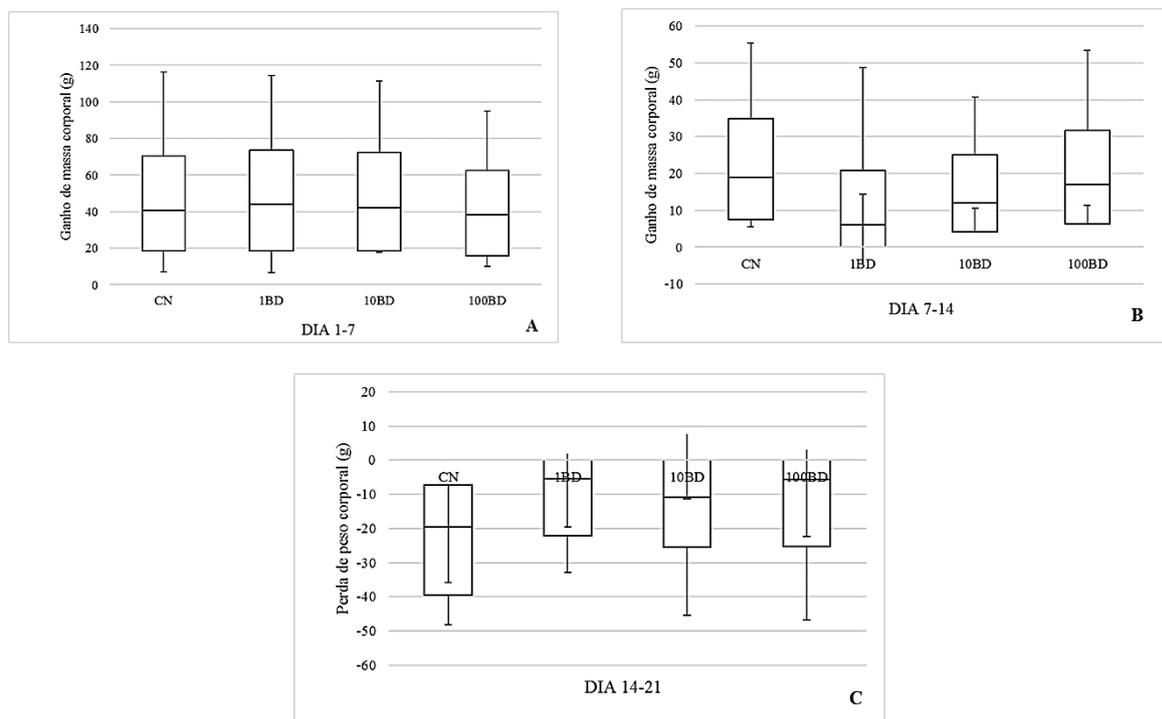


Figura 4. Evolução da massa corporal lactacional de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação, do dia 1 ao dia 7 (**A**), do dia 7 ao dia 14 (**B**), do dia 14 ao dia 21 (**C**). Os dados são expressos em mediana e intervalos interquartis (25/75%) (n= 20). Teste Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas ($P > 0,05$).

3.3 Comportamento em campo aberto

O comportamento das fêmeas no GD15, avaliado através da observação em vídeo por 5 minutos, mostrou que não houve alteração significativa ($P > 0,05$) na frequência de entrada no centro, frequência de entrada na periferia, permanência sobre as duas patas traseiras (*rearing*), autolimpeza (*grooming*) e quantidade de bolos fecais, como pode ser visualizado a seguir (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência de entrada no centro, frequência de entrada na periferia, permanência sobre as duas patas traseiras (*rearing*), frequência de locomoção, autolimpeza (*grooming*) e quantidade de bolos fecais no campo aberto de fêmeas expostas à salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação, sendo o teste realizado no GD15 (15º dia gestacional). ($n=8$ por grupo). Os dados são média \pm EPM ($n=8$).

		Grupos			
Comportamento		CN	1BD	10BD	100BD
Latência	1º	8,5(5,75:17)	29(8:74,5)	10(7,25:30)	8(6:16)
entrada lateral					
Frequência	de	9(5,75:14,75)	4(2:6,5)	6,5(4,75;12,5)	10(8:13)
entrada no centro					
Frequência	de	94(62,5:104,75)	48(62:83,5)	64(52,5:102)	68,5(64,5:84,25)
entrada na periferia					
Rearing		21,5(17,75:28,75)	22(18,5:26)	18(14,75:23)	27(19:33)
Grooming		2,5(1,75;3,25)	0(0:1)	0,5(0:2)	3(2:4)
Bolos	fecais	0(0:1)	0(0:0,5)	0	0
(quantidade)					

Os dados são expressos em mediana e intervalos interquartis (25/75%), Kruskal-wallis seguido de teste de Dunn.

3.4 Comportamento materno

O comportamento foi avaliado através da observação, em vídeo, do comportamento da mãe em relação aos seus filhotes. Foram analisadas as latências e tempos gastos em cada comportamento, não sendo encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados com boldina e o grupo controle ($P > 0,05$), para tempo da mãe envolvida em lambar os filhotes, tempo dispensado na construção do ninho, qualidade do ninho, tempo dispensado na amamentação e cuidados com a progênie e no tempo envolvido na busca dos filhotes, latência para buscar os filhotes, latência para construção do ninho e latência para o aleitamento. Todavia a latência para o comportamento de lambar está reduzida nos grupos tratados com 10 mg/kg e 100 mg/kg ($P < 0,05$) (Figura 5 e 6).

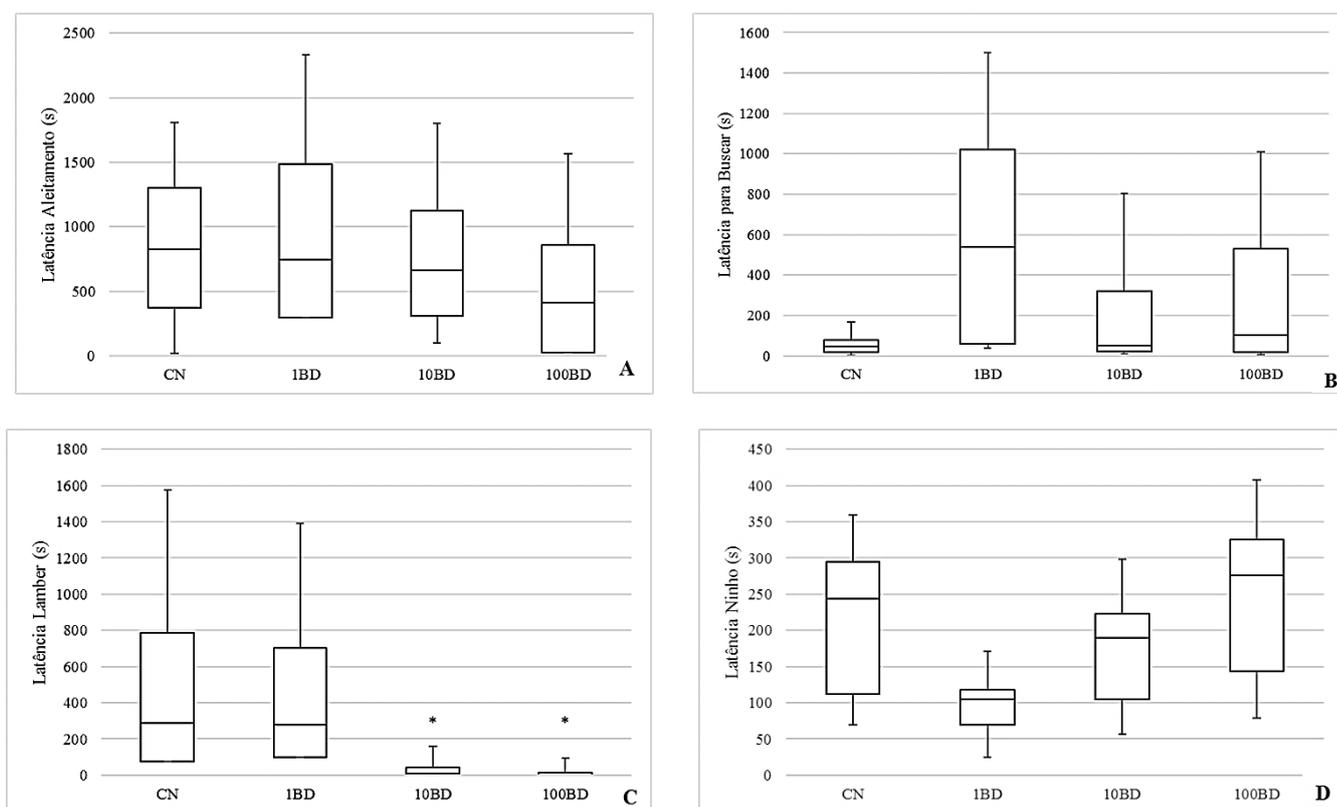


Figura 5. Latência para os comportamentos relacionados ao comportamento materno (comportamento de amamentar (A), comportamento de busca dos filhotes (B) comportamento de lambar (C), construção do ninho (D)). O valor máximo de 480 segundos como tempo máximo para carregar os filhotes foi utilizado, sendo considerado após isso comportamento não realizado de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação. ($n=8$ /grupo). Os dados são expressos em mediana e intervalos interquartis (25/75%), Kruskal-wallis seguido de teste de Dunn. * $P < 0,05$)

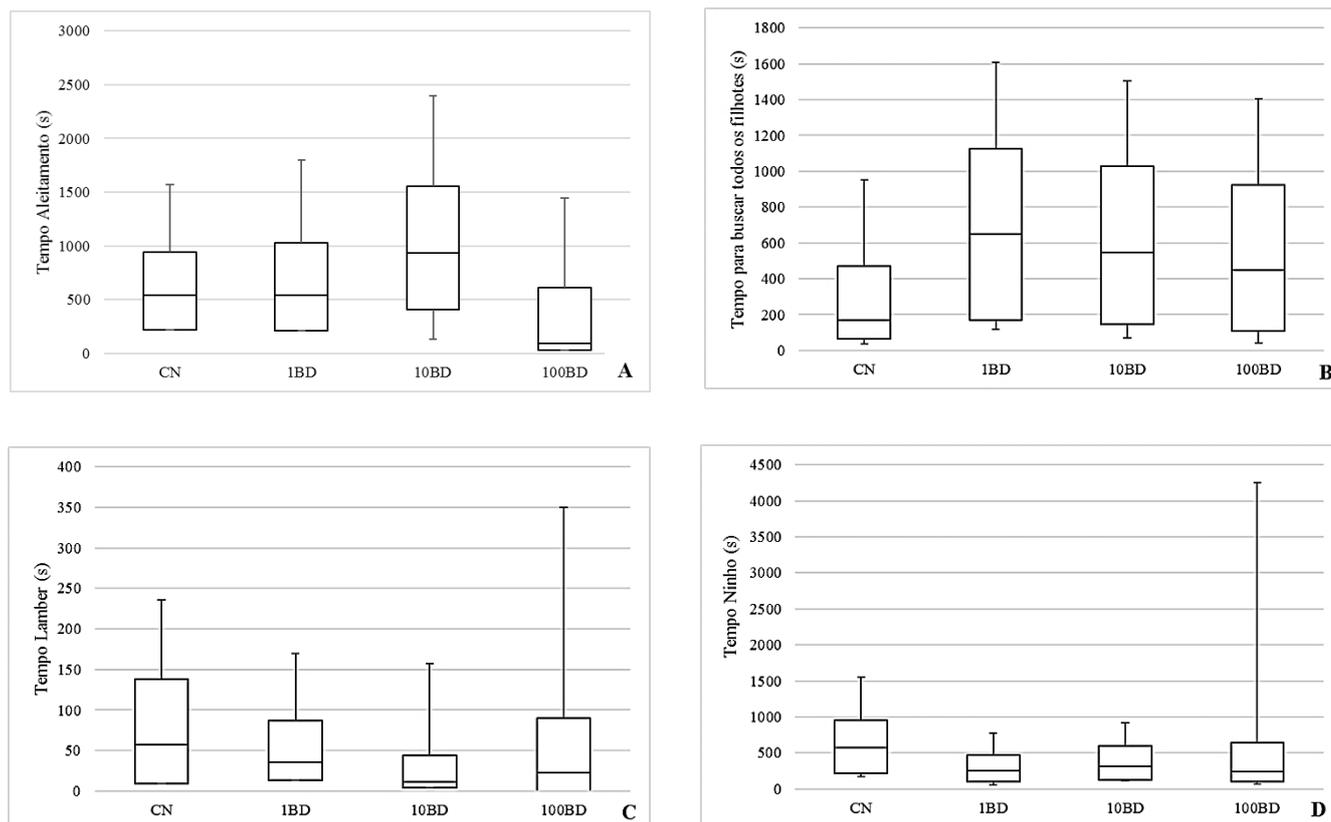


Figura 6. Tempo gasto no comportamento de amamentação dos filhotes (A), tempo gasto no comportamento de busca dos filhotes (B), tempo gasto no comportamento de lambar os filhotes (C) e tempo gasto na construção do ninho (D) de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação. Os dados são expressos em mediana e intervalos interquartis (25/75%). $P > 0,05$ (8/grupo), Kruskal-wallis seguido de teste de Dunn).

3.1.4 Análise histológica

Não foi encontrada nenhuma alteração histológica com significado patológico nas amostras analisadas (n=20).

3.1.2 Peso relativo dos órgãos

Houve diferença estatística no peso relativo do fígado de fêmeas tratadas com boldina na dose de 100 mg/kg quando comparado com os demais grupos de tratamento ($P < 0,05$), sendo este órgão de tamanho reduzido. O peso relativo médio do rim direito das fêmeas tratadas com boldina diferiram estatisticamente dos valores obtidos para o grupo controle negativo ($P < 0,05$).

Tabela 3. Peso relativo dos órgãos de fêmeas expostas a salina (CN), 1 mg.kg⁻¹ de boldina (1BD), 10 mg.kg⁻¹ de boldina (10BD), 100 mg.kg⁻¹ de boldina (100BD) durante a gestação. (n=20 por grupo). Os dados são média ± EPM (n= 20).

Peso relativo %	Grupos			
	CN	1BD	10BD	100BD
Coração	0,346 ± 0,04	0,308 ± 0,05	0,326 ± 0,03	0,337 ± 0,02
Baço	0,264 ± 0,04	0,271 ± 0,02	0,267 ± 0,02	0,308 ± 0,03
Fígado	4,607 ± 0,57	4,864 ± 0,61	4,608 ± 0,57	4,526 ± 0,40*
Rim direito	0,422 ± 0,06	0,395 ± 0,04*	0,394 ± 0,04*	0,409 ± 0,04*
Rim esquerdo	0,391 ± 0,05	0,381 ± 0,04	0,378 ± 0,04	0,383 ± 0,03
Ovário direito	0,021 ± 0,003	0,023 ± 0,003	0,024 ± 0,006	0,020 ± 0,003
Ovário esquerdo	0,020 ± 0,004	0,024 ± 0,003	0,024 ± 0,004	0,025 ± 0,011
Útero	0,115 ± 0,03	0,131 ± 0,03	0,140 ± 0,04	0,131 ± 0,02

* Diferença significativa ($P < 0,05$), em relação ao grupo controle (CN). Os dados são media ± EPM. (ANOVA).

4 DISCUSSÃO

O desempenho reprodutivo de fêmeas tratadas com boldina mostrou alterações quando comparamos fêmeas tratadas com boldina nas doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg e o controle negativo (salina, NaCl 0,9%); houve diferença nas taxas gestação e na taxa de fertilidade. A taxa de fertilidade alterada, indica que as maiores doses de tratamento com boldina tiveram perdas pré-implantação. A taxa de gestação mostra as perdas pré e pós implantação, já que verificamos as gestações com filhotes, e portanto, pela diferença entre a taxa de fertilidade e gestação pode-se ver que o grupo tratado com a dose intermediária de boldina (10 mg/kg) apresentou perdas pós-implantação num estágio mais avançado da gestação, ou seja, as fêmeas gestaram, mas perderam todos os filhotes durante o desenvolvimento fetal. A taxa de fertilidade diminui conforme aumenta a dose de tratamento com boldina, indicando que as perdas pré-implantação ocorrem de forma dose dependente, sendo maior no grupo tratado com 100 mg/kg. As mães tratadas com boldina durante período descrito tiveram um maior número de filhotes mortos ao nascimento, nas doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg, sendo a maior taxa na dose menor. As fêmeas tratadas com boldina tiveram filhotes que morreram ao longo do desenvolvimento, em todas as doses, o que não ocorreu no grupo tratado com controle. Ao compararmos as perdas gerais pós-implantação verificamos

que quanto maior a dose de tratamento ocorreram mais gestações com perdas, chegando a 75% de gestações com algum tipo de perda pós-implantação, na dose de 100 mg/kg. Com base nos estudos realizados com boldina até o momento, a provável causa dessas perdas seria o relaxamento da musculatura lisa uterina, sendo provavelmente a causa das perdas pré-implantação como das perdas pós-implantação. Um estudo realizado com o falso-boldo, que também contém boldina, mas em menor concentração, demonstrou que quando esse é administrado a animais no período de pré-implantação causa um aumento significativo da perda embrionária, e que esse efeito provavelmente seria devido a um efeito relaxante sobre a mobilidade tubária (ALMEIDA, LEMÔNICA, 2000).

A toxicidade sistêmica pode ser identificada pela diminuição do peso corporal dos animais e por alterações nos consumos de água e ração, sendo esses, importantes para a avaliação da toxicidade de uma substância, pois fornecem informações do estado geral de saúde dos animais (VALADARES, 2006). Os dados relativos aos consumos de ração e o consumo de água demonstraram que o consumo não foi diferente entre os grupos tratados e o grupo controle; resultado importante nos estudos de desenvolvimento e toxicidade reprodutiva, já que uma redução no consumo pode acarretar em efeitos na gestação (LEICHTER; LEE, 1984; CAMPBELL *et al.*; 2009). Como não houve alteração, pode-se afirmar que as alterações encontradas foram apenas pelo tratamento com boldina em suas diferentes concentrações.

O ganho de peso das fêmeas no período gestacional e lactacional não apresentou alteração significativa quando comparado com o controle e entre sí, entretanto, pode-se perceber que o grupo tratado com 10 mg/kg é mais homogêneo e não altera tanto seu peso durante o período lactacional. Pode-se ainda verificar que na última semana antes da separação da progenitora da ninhada, esse grupo foi o que menos apresentou perda de peso no período (14 a 21 dias de lactação), indicando que mesmo sendo um período de grande perda de peso da fêmea já que os filhotes crescem muito nesse período esse grupo as fêmeas mantiveram seu peso.

A boldina é um alcaloide com ação no SNC, com ação em diversos tipos de receptores (ação principal conhecida como antagonista de DA) (ZETLER, 1998). Por agir em diversos receptores pode causar alterações em comportamentos como os registrados em campo aberto nas fêmeas gestantes tratadas com boldina. Todavia não foram encontradas alterações estatisticamente significativas em nenhuma das variáveis avaliadas (n=8). Uma possível explicação para não ocorrer diferença entre os grupos

tratados e o controle seria a meia vida curta da boldina no plasma (31 minutos) e sua baixa concentração no SNC (0,36 μ M, 3,6 μ M e 36 μ M, nas doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg de boldina respectivamente, baseando-se em estudos prévios com as doses de 50 mg/kg de boldina) (JIMENEZ; SPEISKY, 2000). Entretanto, existem estudos que demonstram alterações em comportamentos em doses semelhantes a utilizada, como nos comportamentos de *yawning* e *penile erection model*, dependente de receptores D2, na dose de 40 mg/kg i.p, indicando que essas doses poderiam causar alterações de comportamento em animais) (O'BRIEN *et al.*, 2006).

O período neonatal corresponde ao período onde as ligações sociais do animal são primariamente formadas (SCOTT, 1962). Durante esta fase o organismo está altamente sensível aos efeitos de estímulos ambientais, como, a manipulação por parte do experimentador, ou alterações no comportamento materno. As estimulações neonatais que induzem as alterações comportamentais e neuroendócrinas parecem persistir ao longo da vida do animal (FRANCIS *et al.*, 1996). O comportamento de lambe os filhotes (*Pup Licking*) é um dos comportamentos analisados e, é muito importante; este comportamento ocorre por todo o corpo e pela região anogenital (períneo) e seu propósito é estimular a excreção dos filhotes e, além disto, serve como reposição de água e eletrólitos para a mãe lactante, já que ela ingere a urina dos filhotes (GUBERNICK; ALBERTS, 1985). O comportamento de lambe ocorre em alta frequência nos primeiros dias após o parto e a frequência de lambe a região anogenital é maior nos filhotes machos que nas fêmeas (MOORE; MORELLI, 1979). O comportamento de lambe os filhotes é um importante estímulo tátil que pode influenciar no desenvolvimento social dos filhotes machos e fêmeas quando adultos, sendo o comportamento sexual muito importante neste quesito (BIRKE; SADLER, 1987; MOORE, 1992). Este comportamento influencia o comportamento materno futuro, pois os filhotes fêmeas que receberam uma quantidade de lambidas maior ficarão mais tempo com seus filhotes quando forem mães (FRANCIS *et al.*, 2000).

Extensas pesquisas delinearam os circuitos neurais básicos que medeiam a expressão do comportamento maternal e a visão atual é que os sistemas de DA mesolímbica e mesocorticais fazem parte de um sistema motivacional não específico ou geral, que serve para aumentar a capacidade de resposta de um organismo a uma vasta variedade de estímulos biologicamente significativos, incluindo os filhotes (CHEN *et al.*, 2014), e que a DA está envolvida em ambas fases de regulação do comportamento (BRIDGES, 1996). A serotonina é um neurotransmissor importante ligado em muitos

processos psicológicos relevantes para o comportamento materno (VEIGA *et al.*, 2007); estudos mostram que uma alteração nesta via pode romper o comportamento materno (CHEN *et al.*, 2014). Estudos com lesões mostraram que neurônios dopaminérgicos que inervam o núcleo *accumbens* podem ser particularmente importantes para os aspectos locomotores do comportamento materno, como o comportamento de busca dos filhotes (HANSEN *et al.*, 1991; HANSEN, 1991). Todavia, lesões no caudado-putâmen (estriado dorsal) não causaram nenhum efeito sobre ambas as fases do comportamento materno (HANSEN *et al.*, 1991). Como é sabido, o sistema dopaminérgico mesolímbico está envolvido em processos motivacionais, tais como recompensa e reforço (STERN; KEER, 1999). Expor a mãe aos filhotes (reforçando estímulos) induz a liberação DA no núcleo *accumbens* e *striatum* dorsal (FLEMING *et al.*, 1994). Substâncias que bloqueiam os receptores D2 *like* de dopamina como o haloperidol (0.1 mg/kg) induzem redução no comportamento de busca dos filhotes e na qualidade do ninho (SILVA *et al.*, 2001). Vista sua ação como bloqueador dos receptores dopaminérgicos (ZETHER, 1988; ASECIO, 1999), a utilização da boldina pode causar alterações no comportamento materno, já que a via dopaminérgica está muito relacionada com o comportamento materno;

A latência para lambar os filhotes (*pup licking*) é menor nos grupos tratados com 10 mg/kg e 100 mg/kg. Este comportamento, descrito como tão importante quanto a lactação, tem papel nos sistemas neurais e altera a plasticidade do SNC (VAN OERS *et al.*, 1998). Ao nascerem, os mamíferos não estão com o sistema nervoso plenamente desenvolvido. Nos ratos, o sistema nervoso está suscetível a alterações ambientais logo após o nascimento. O desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse pode ser modificado por eventos que ocorrem durante este período (MEANEY *et al.*, 1993). Então, alterações neste comportamento podem gerar modificações na resposta dos filhotes no teste de reflexos por exemplo.

Entretanto, não ocorreu alteração significativa estatisticamente no comportamento de busca dos filhotes e na qualidade do ninho como visto em estudos anteriores com antagonistas de dopamina.

Até o momento, em virtude da observação de alterações anatômicas e nos blastocistos, além de alguma atividade abortiva quando se administrou extratos de *P. boldus* e boldina durante a gestação (500 mg/kg e 800 mg/kg, em dois experimentos, separando a gestação em duas fases) era recomendado evitar o uso dessa substância durante esse período (ALMEIDA *et al.*, 2000). Entretanto, as doses de boldina utilizada

nesse estudo são altas se considerarmos a concentração do alcaloide boldina na folha de *P. boldus* (0,14%) (QUEZADA *et al.*, 2004; GOTTELAND *et al.*, 2004). Lembrando que e a quantidade de boldina presente em 40g de folhas de *P. boldus* (quantidade recomendada para tratamento de náuseas segundo Spethmann (2003) e também a dose recomendada pela ESCOP para disfunções hepatobiliares leves e distúrbios gastrointestinais (2 – 5g de boldo a cada 100ml água), ambos recomendando dose diária de 1l de chá). Neste estudo identificou-se efeito tóxico da boldina em doses menores, 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg, entretanto as fêmeas foram tratadas durante todo o período gestacional. Todas as doses causaram alteração de algum tipo no comportamento da fêmea ou nos aspectos reprodutivos.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento de fêmeas com boldina nas doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg, e segundo estudos anteriores deve-se a sua interferência na implantação embrionária, aumentando as perdas pré-implantação e também com os conceptos após este período. O comportamento materno de fêmeas tratadas com boldina também apresentou alterações, e como descrito na literatura, alterações no comportamento materno podem modificar a resposta da prole a diversos estímulos e comportamentos e por essa razão é uma variável importante para o desenvolvimento geral e reprodutivo da prole. Portanto o tratamento com boldina deve ser evitado durante o período gestacional, mesmo em doses baixas como as encontradas no chá de boldo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.C.G.; LEMONICA, I.P. The toxicity of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **J Ethnopharmacol.** v.73, n.1-2, p.53-60, 2000.
- ARRATI, P.; CARMONA, C.; DOMINGUEZ, G.; BEYER, C.; ROSEMBLATT, J. GABA receptor agonists in the medial preoptic área and maternal behavior in lactating rats. **Physiology and Behavior.** v. 87, p. 51-65, 2006.
- ASANO, Y. Characteristics of open field behavior of Wistar and Sprague-Dawley rats. **Experimental Animals.** v.35, n.4, p. 505-508, 1986.
- ASENCIO, M.; DELAQUERRIERE, B.; CASSEL, S. B. K.; SPEISKY, H.; COMOY, E.; PROTAIS, P. Biochemical and behavioral effects of boldine and glaucine on dopamine systems. **Pharmacol Biochem Behav,** 62: 7–13, 1999.

- BIRKE, L. I. A.; SADLER, D. Differences in maternal of rts and the sociosexual development of the offspring. **Development Psychobiology**, 10(1): 85-99, 1987.
- BRIDGES, R. S. Biochemical Basis of Parental Behavior in the Rat. **Advances in the Study of Behavior**. Academic Press. Volume 25: 215-242, 1996.
- CAMPBELL, M.A.; GOLUB, M.S.; IYER, P.; KAUFMAN, F.L.; LI, L.; MESSEN, F.M.; MORGAN, J.E.; DONALD, J.M. Reduced water intake: implications for rodent developmental and reproductive toxicity studies. **Birth Defects Research (Part B)**. v.86, p. 157- 175, 2009.
- CHAMPAGNE, F.; FRANCIS, D.; MAR, A.; MEANEY, M. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects on environment on development. **Physiology and Behavior**. v. 79, p. 359-371, 2003.
- CHEN, W. H.; ZHANG, Q.; SU, W. X.; ZHANG, H. R.; YANG, Y.; QIAO, J.; SUI, N.; LI, M. Effects of 5-hydroxytryptamine 2C receptor agonist MK212 and 2A receptor antagonist MDL100907 on maternal behavior in postpartum female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 117: 25-33, 2014.
- CLARKE, J. H. R. et al. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Infarma**, v.19, n.1/2, p.41-8, 2007.
- COSTA, L.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v.44, p.87-110, 2004.
- COSTA, P.A.; POLI, J.H.Z.; SPEROTTO, N.D.M.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; NIN, M.S.; BARROS, H.M.T. Brain DNA damage and behavioral changes after repeated intermittent acute ethanol withdrawal by young rats. **Psychopharmacology**. v. 232, p.3623-3636, 2015.
- EPA – Environmental Protection Agency. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**. Federal Register v.61, n.212, p.56274-56322, october, 1996.
- ESCOP. MONOGRAPHS on the medicinal uses of plant drugs. **European Scientific Cooperative on Phytotherapy – ESCOP**, 1997.
- FRANCIS, D. D.; DIORIO, J.; LAPLANTE, P.; WEAVER, S.; SECKEL, J.R.; MEANEY, M. J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. **Annals New Academy of Sciences**, 794:136-152, 1996.
- FRANCIS, D. D.; CHAMPAGNE, F.C.; MEANNEY, M.J. Variation in maternal behavior are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, 12: 1145-1148, 2000.
- GOTTELAND, M.J. et al. Effect of a dry boldo extract on oro-cecal intestinal transit in healthy volunteers, **Rev. Med. Chil**. 123 (1995) 955–960.
- GUBERNICK, D. J.; ALBERTS, J.R. Maternal licking by virgin and lactating rats: water transfer from pups. **Physiology and Behavior**: 501-506, 1985.
- HANSEN, S., et al. The effects of 6-OHDA-induced dopamine depletions in the ventral or dorsal striatum on maternal and sexual behavior in the female rat. **Pharmacol Biochem Behav**, 39(1): p. 71-7, 1991.
- HANSEN, S., et al., Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness. **Behav Neurosci**. 105(4): p. 588-98, 1991.
- MEANEY, M. J.; BHATNAGAR, S.; LAROCQUE, C. K.; MCCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V.; PLOTSKY, P. M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Annals New York Academy of Science**, 697:70-85, 1993.

MENGUE, S.S.; SCHENKEL, E.P.; MENTZ, L.A.; SCHMIDT, M.I. Especies vegetales utilizadas por embarazadas con el objeto de provocar la menstruación (Encuesta a siete ciudades de Brasil). **Acta Farmacéutica Bonaerense**. v.16, n.2, p.251-8, 1997.

MOORE, C. L.; MORELLI, G.A. Mother rats interact differently with male and female offspring. **Journal of Comparative Physiological Psychology**, 93 (4): 677-684, 1979.

MOORE, C. L. The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis. **Annals New York Academy of Sciences** 662: 160-177, 1992.

LEICHTER, J.; LEE, M. Does dehydration contribute to retarded fetal growth in rats exposed to alcohol during gestation? **Life Sci**. v. 35, p. 2105–2111, 1984.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, n. 1, p. 1-17, 2006.

QUEZADA, M.; ASECIO M.; DEL VALLE J.M.; AGUILERA J.M.; GÓMEZ B. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves, **J. Food Sci**. v.69, p.371–376, 2004.

PEREIRA, M.; FERREIRA, A. Demanding pups improve maternal behavior impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. **Behavioural Brain Research**. v. 175, p. 139-148, 2006.

SCOTT, J. P. Critical periods in behavior development. **Science**, 138: 949-958, 1962.

SILVA, M. R. P.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Effects of dopamine receptor antagonists on ongoing maternal behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 68(3): 461-468, 2001.

SOUZA, F.L.; LAZZARI, V.; AZEVEDO, M.S.; ALMEIDA, S.; SANVITTO, G.L.; LUCION, A.B.; GIOVENARDI, M. Progesterone and maternal aggressive behavior in rats. **Behavioural Brain Research**. v. 212, p. 84-89, 2010.

SOUZA, M.A.; SZAWKA, R.E.; CENTENARO, L.A.; DIEHL, L.A.; LUCION, A.B. Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. **Physiology & Behavior**. v. 105, p. 850-855, 2012.

STERN, J.M; KEER, S.E. Maternal motivation of lactating rats is disrupted by low dosages of haloperidol. **Behav Brain Res**. 99(2): p. 231-9, 1999.

WHO. **Organización Mundial de la Salud Ginebra**. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. 2005.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégia após a “Era do Teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VAN OERS, H. J.; DE KLOET, E. R.; WHELAN, T.; LEVINE, S. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. **The Journal of Neuroscience**, 18(23):10171-10179, 1998.

VEIGA, C. P.; MICZEK, K. A.; LUCION, A. B.; ALMEIDA, R. M. M. de. Effect of 5-HT_{1B} receptor agonists injected into the prefrontal cortex on maternal aggression in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 40(6): 825-830, 2007.

ZETLER, G. Neuropeptide-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of apomorphine alkaloids:bulbocapnine, corutuberine, boldine and glaucine **Arch. Int. Pharmacod. Ther**. 296: 255-81, 1988.

5 CONCLUSÕES

Objetivava-se neste estudo avaliar os efeitos do alcaloide boldina sobre fêmeas tratadas durante o período gestacional (Segmento I) e seus efeitos sobre o desenvolvimento da progênie exposta durante as fases de desenvolvimento fetal (Segmento III).

Referente ao segmento I foram encontradas alterações no desempenho reprodutivo das fêmeas quanto as taxas de gestação e fertilidade e quanto as perdas ao nascimento, pré e pós implantação, e mortes ao nascimento e pós-natais. O comportamento materno, que é uma variável importante do desempenho reprodutivos de ratas já que pode alterar o desenvolvimento da prole a curto e longo prazo também foi modificado pela administração da boldina durante o período gestacional.

Quanto ao segmento II, foram encontradas alterações nas proles de fêmeas tratadas com boldina no período gestacional, em seu desempenho nos testes de reflexos (teste de endireitamento, geotaxia e agarrar), físico (abertura de olhos) e reprodutivo (abertura vaginal, descida de testículos e separação prepucial), assim como alteração no peso de órgãos de machos e fêmeas, na produção de espermatozoides e no percentual de espermatozoides com alteração (anormais).

Concluimos, portanto, que o uso da boldina e conseqüentemente do chá de *Peumus boldus* deve ser evitado durante o período gestacional.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.R.; MELO, A.M.; XAVIER H. Toxicological Evaluation of the Hydro-alcohol Extract of the Dry Leaves of *Peumus boldus* and boldine in Rats. **Phytotherapy Research**. v.14, n.2, p.99-102, 2000.

ALMEIDA, F.C.G.; LEMONICA, I.P. The toxicity of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **J Ethnopharmacol**. v.73, n.1-2, p.53-60, 2000.

AMERICAN BOTANICAL COUNCIL. The Complete German Commission E Monographs, Texas, 1998.

ANISMAN, H.; ZAHARIA, M.D.; MEANEY, M. J.; MERALI, Z. Do early life permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? **Internacional Journal of Developmental Neuroscience**, v.16, p.149-164, 1998.

ARRATI, P.; CARMONA, C.; DOMINGUEZ, G.; BEYER, C.; ROSEMBLATT, J. GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats. **Physiology and Behavior**. v. 87, p. 51-65, 2006.

ASENCIO, M.; DELAQUERRIERE, B.; CASSEL, S. B. K.; SPEISKY, H.; COMOY, E.; PROTAIS, P. Biochemical and behavioral effects of boldine and glaucine on dopamine systems. **Pharmacol Biochem Behav**, v.62, p.7-13, 1999.

BAZZETT, T.J.; BECKER, J.B. Sex differences in the rapid and acute effects of estrogen on striatal D2 dopamine receptor binding. **Brain Res**. v.637, n.1-2, p.163-72, 1994.

BEAULIEU, J.; GAINETDINOV, R. R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. **Pharmacol Rev.**, v.63, n.1, p.182-217, 2011.

BELEW, C. Herbs and Childbearing woman. **J. Nurse Midwifery**. v.44, n.3, p.231-52, 1999.

BENNETI, F. **Intervenções na relação mãe-filho e seus efeitos nas respostas comportamentais e endócrinas na vida adulta**. Tese de doutorado. UFRGS, 87p, 2005.

BIRKE, L. I. A.; SADLER, D. Differences in maternal of rats and the sociosexual development of the offspring. **Development Psychobiology**, v.10, n.1, p.85-99, 1987.

BISSET, N.G.; WICHTL, M. **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals**. CRC Press, Stuttgart, 1994.

BRANDT, W.; GILG, E.; SCHÜRHOFF, P.N. **Farmacognosia. Materia Farmacéutica vegetal y animal**. Ed. Labor, 2 ed., Barcelona, 1942.

BRASIL. Ministério da Saúde. **ANVISA**. Portaria 116, de 08 de agosto de 1996. Diário Oficial da União, 12.08.1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **ANVISA**. Portaria 48, de 16 de março de 2004a. Diário Oficial da União, 18.03.2004.

BRIDGES, R. S. Biochemical Basis of Parental Behavior in the Rat. **Advances in the Study of Behavior**. Academic Press, v.25, p.215-242, 1996.

BRUN, P. **Précis de Matière Médicale**. G. Doin Ed., Paris, 1936.

BRUNETON, J. **Farmacognosi**. 2 ed., Ed. Acribia, Zaragoza, 2001.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **Goodman & Gilman: As Bases farmacológicas da Terapêutica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CALDJI, C.; TANNENBAUM, B.; SHARMA, S; FRANCIS, D.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Maternal care during infancy regulates the development of neural system mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p.5335-5340, 1998.

CAMPBELL, M.A.; GOLUB, M.S.; IYER, P.; KAUFMAN, F.L.; LI, L.; MESSEN, F.M.; MORGAN, J.E.; DONALD, J.M. Reduced water intake: implications for rodent developmental and reproductive toxicity studies. **Birth Defects Research (Part B)**. v.86, p.157- 175, 2009.

CAMPESATO, V.R.; Uso de Plantas Mediciniais Durante a Gravidez e Risco para Malformações Congênitas. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p.58-65, 2000.

CASTNER, S.A.; XIAO, L.; BECKER, J.B. Sex differences in striatal dopamine: in vivo microdialysis and behavioral studies. **Brain Res**, vol. 610, p.127-34, 1993.

CASTRO, V. L. **Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-Filhote Expostos a Agroquímicos**. Circular técnica 13, Embrapa Meio ambiente, Jaguariúna, SP. 2006.

CEDERBAUM A.; KUKIELKA E.; SPEISKY H. Inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation by boldine. **Biochem Pharmacology**, v.44, p.1765–1772, 1992.

CIGANDA, C.; LABORDE, A. Herbal infusions used for induced abortion. **J Toxicol Clin Toxicol**. v.41, n.3, p.235-9, 2003.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Procedimentos e Métodos de Eutanásia em Animais**. Resolução Nº1.000, de 11 de maio de 2012.

CHAHOU, I; FAQI, A.S. An optimized approach for the assessment of sexual behavior in male rats. **Reproductive Toxicology**, v.12, n.6, p. 667–671, 1998.

CHAMPAGNE, F.; FRANCIS, D.; MAR, A.; MEANEY, M. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects on environment on development. **Physiology and Behavior**. v.79, p. 359-371, 2003.

CHEN, W. H.; ZHANG, Q.; SU, W. X.; ZHANG, H. R.; YANG, Y.; QIAO, J.; SUI, N.; LI, M. Effects of 5-hydroxytryptamine 2C receptor agonist MK212 and 2A receptor antagonist MDL100907 on maternal behavior in postpartum female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.117, p25-33, 2014.

CHULI'A, S.; MOREAU, J.; NALINE, E.; NOGUERA, M.A.; IVORRA, M.D.; D'OCÓN, M.P.; ADVENIER, C. The effect of S-(+)-boldine on the α 1-adrenoceptor of the guinea-pig aorta. **Br. J. Pharmacol**, v.119, p.1305–1312, 1996.

CHUNG, L.Y.; LO, M.W.; MUSTAFA, M.R.; GOH, S.H.; IMIYABIR, Z. 5-Hydroxytryptamine2A receptor binding activity of compounds from *Litsea sessilis*. **Phytother Res**, v.23, p.330–4, 2009.

CLARKE, J. H. R. et al. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Infarma**, v.19, n.1/2, p.41-8, 2007.

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2a. Ed. São Paulo: H.A. Rothschild, 1996. 259p.

COIMBRA, R ; SILVA, E.D. **Notas de Fitoterapia**, 2 ed., Lab. Clínico Silva Araújo, Rio de Janeiro, 1958.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**. Brasília/DF, 54p., 2013a.

- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diretriz **Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA**. Brasília/DF, 50p., 2013b.
- DE LA HERAS, B.; RIOS, J.L.; MARTINEZ-MIR, I.; RUBIO, E. A study of the adrenergic activity of the alkaloids boldine and glaucine. *Pharmazie* v.45, p.443-4, 1990.
- COSTA, L.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v.44, p.87-110, 2004.
- COSTA, P.A.; POLI, J.H.Z.; SPEROTTO, N.D.M.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; NIN, M.S.; BARROS, H.M.T. Brain DNA damage and behavioral changes after repeated intermittent acute ethanol withdrawal by young rats. **Psychopharmacology**. v. 232, p.3623-3636, 2015.
- DELOUMER J. Action instetinale de la boldine. **Compt Rend Hebd Acad Sci**, v.229, p.953-5, 1949.
- DUKE, J.A. **The Green Pharmacy Herbal Handbook**. Rodale Press, New York, 2000.
- EBISUI, L.; FONTES, R.S.; LAPCHIK, V.B.V. Rato. In: **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. (orgs). São Paulo: Ed. Atheneu. p.229–250, 2009.
- EPA – Environmental Protection Agency. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**. Federal Register, vol. 61, n.212, p.56274-56322. October, 1996.
- ESCOP. MONOGRAPHS on the medicinal uses of plant drugs. **European Scientific Cooperative on Phytotherapy – ESCOP**, 1997.
- FANTONI, D.T; CORTOPASSI, S.R.G.; BERNARDI, M.M. Anestésicos Intravenosos e Outros Parenterais. In: SPINOSA, H.S. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- FAQI, A.S.; DALSENTER, P.R.; MERKER, H-J. et al. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of TCDD in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.150, p. 383–92, 1998.
- FARMACOPOEA PORTUGUESA VII. **Ministério da Saúde**, Lisboa, 2002
- FEBO, M.; FELIX-ORTIZ, A.C.; JOHNSON, T.R. Inactivation or inhibition of neuronal activity in the medial prefrontal cortex largely reduces pup retrieval and grouping in maternal rats. **Brain Res**, v.1325, p.77-88, 2010.
- FLEMING, A.S., et al., Activation of Fos-like immunoreactivity in the medial preoptic area and limbic structures by maternal and social interactions in rats. **Behav Neurosci**, v.108, n.4, p.724-34, 1994.
- FOSTER, S. Tyler's Honest Herbal a sensible guide to the use of herbs and related remedies. 4 Ed. New York: **The Haworth Herbal Press**, p. 442, 1999.
- FRANCIS, D. D.; DIORIO, J.; LAPLANTE, P.; WEAVER, S.; SECKEL, J.R.; MEANEY, M. J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. **Annals New Academy of Sciences**, v.794, p.136-152, 1996.
- FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J.; Maternal care and the development os stress responses. **Current Opinion in Neurobiology**, v.9, n.1, p.128-134, 1999.
- FRANCIS, D. D.; CHAMPAGNE, F.C.; MEANNEY, M.J. Variation in maternal behavior are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v.12, p.1145-1148, 2000.

GALEA, L. A. M.; MCEWEN, B. S.; TANAPAT, P.; DEAK, T.; SPENCER, R. L.; DHABHAR, F. S. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress." **Neuroscience**, v.81, n.3, p.689-697, 1997.

GALLO, M.; KOREN, G. Can herbal products be used safely during pregnancy? Focus on Echinacea. **Can Fam Physician**. v.47, p.1727-8, 2001.

GERHARDT, D.; BERTOLAA, G.; DIETRICH, F.; FIGUEIRÓ, F.; ZANOTTO-FILHO, A.; FONSECA, J.C.M.; MORRENO, F.B.; BARRIOS, C.H.; BATTASTINI, A.M.O.; SALBEGO, C.G. Boldine induces cell cycle arrest and apoptosis in T24 human bladder cancer cell line via regulation of ERK, AKT, and GSK-3 β . **Urologic Oncology**, v. 32, p.36-39, 2014.

GOLDSTEIN, R.A.; DESLAURIERS, C.; BURDA, A.; JOHNSON-ARBOR, K. Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. **Semin Diagn Pathol**. v.26, n.1, p.10-7, 2009.

GONZÁLEZ-CABELLO, R.; SPEISKY, H. BANNACH, R.; VALENZUELA, A.; FEHÉR, J.; GERGELY, P. **J. Invest. Allerg. Clin**, v.4, p.139-45, 1994.

GOTTELAND, M.J. et al. Effect of a dry boldo extract on oro-cecal intestinal transit in healthy volunteers, **Rev. Med. Chil**. v.123, p.955-960, 1995.

GROTA, L. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior**, p.722-729, 1969.

GUBERNICK, D. J.; ALBERTS, J.R. Maternal licking by virgin and lactating rats: water transfer from pups. **Physiology and Behavior**, p.501-506, 1985.

GUPTA, M.P. 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. **CYTED – SECAB**, Santafé de Bogotá, 1995.
HANSEN, S., et al. Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness. **Behav Neurosci**, v.105, n.4, p.588-98, 1991.

HANSEN, S., et al. The effects of 6-OHDA-induced dopamine depletions in the ventral or dorsal striatum on maternal and sexual behavior in the female rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v.39, n.1, p.71-7, 1991.

HANSEN, S., et al., Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness. **Behav Neurosci**, v.105, n.4, p. 588-98, 1991.

HANSEN, S., Maternal behavior of female rats with 6-OHDA lesions in the ventral striatum: characterization of the pup retrieval deficit. **Physiol Behav**, v.55, n.4, p. 615-20, 1994.

HÉRAIL, J. *Traité de matière médicale – Pharmacographie*. **Libr. J. B. Baillière et Fils**, Paris, 1927.

HERNÁNDEZ-SALINAS, R.; VIELMA, A.Z.; ARISMENDI, M.N.; BORIC, M. P.; SÁEZ J.C.; VELARDE, V.; Boldine Prevents Renal Alterations in Diabetic Rats. **Journal of Diabetes Research**, v.2013, 2013.

HOFFMANN, A. **Oecología Plantarum**, v.2, n.16, p.31-9, 1981.

HUE, B.; LE CORRONC, H.; KUBALLA, B.; ANTON, R. Effects of the natural alkaloid boldine on cholinergic receptors of the insect central nervous system., **Pharm. Pharmacol. Lett**. v.3, p.169-172, 1994.

HUOT, R. G. M.; LADD, C.; THRIVIKRAMAN, K.; PLOTSKY, P. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v.29, p.279-289, 2004.

- HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; RASHEED, S.; NIGAM, P. S.; JANNEH, O.; SARKER, S. D. Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, p.943-952, 2011.
- ITURRIAGA-VASQUEZ, P.; PEREZ, E.G.; SLATER, E.Y.; BERMUDEZ, I.; CASSELS, B.K. Aporphine metho salts as neuronal nicotinic acetylcholine receptor blockers. **Bioorg Med Chem**, v.15, p.368-72, 2007.
- IVORRA, M.D.; CHULIÁ, S.; LUGNIER, C.; D'OCÓN, M.P. Selective action Showed by two aporphines at alphaadrenergic receptors and in the potential-operated calcium Channel. **Eur J Pharmacol**, v.231, p.165-74, 1993.
- JANG, Y.Y.; SONG, J.H.; SHIN, Y.K.; HAN, E.S.; LEE, C.S. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacol. Res.** v.42 p.361-37, 2000.
- JIMÉNEZ, I.; SPEISKY, H. Biological disposition of boldine: in vitro and in vivo studies. **Phytother. Res**, v.14 p.254-60, 2000.
- KANG, J.J.; CHENG, Y.W.; FU, W.M.; Studies on neuromuscular blockade by boldine in the mouse phrenic nerve-diaphragm, Jpn. **J. Pharmacol**, v.76, p.207-212, 1998.
- KREITMAIR, H. Pharmakologische Wirkung des Alkaloids aus *Peumus boldus* Molina. **Die Pharmazie**. 7: 507-11, 1952.
- KRINGSTEIN, P.; CEDERBAUM, A. **Free Rad. Biol. Med.** 18: 559-63, 1995.
- KVERNMO, T.; HÄRTTER, S.; BURGER, E. A review of the receptor-binding and pharmacokinetic properties of dopamine agonists. **Clinical therapeutics**, v. 28, n. 8, p. 1065-78, 2006.
- KONRATH, L.E.; SANTIN, K.; NASSIF, M.; LATINI, A.; HENRIQUES, A.; SALBEGO, C. Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation in vitro. **Neurotoxicology**, v.29, p.1136-1140, 2008.
- LABORDE: *Compt. Rend. Acad. Sci.* 98: 1053,1884, through Kreitmair, 1952.
- LANHERS, M.C.; JOYEUX, M. R.; SOULIMANI, J. FLEURENTIN, SAYAG, M.; MORTIER, F.; YOUNOS, C.; PELT, J.M.; Hepatoprotective and antiinflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile *Peumus boldus*, *Planta Med*, v.57, p.110-115, 1991.
- LAU, Y. S.; TIAN, X. Y.; HUANG, Y.; MURUGAN, D.; ACHIKE, F. I.; MUSTAFA, M. R. Boldine protects endothelial function in hyperglycemia-induced oxidative stress through an antioxidant mechanism. **Biochemical pharmacology**, v.85, p.367-375, 2013.
- LAU, Y.S; LING W.C.; MURUGAN, D.; MUSFATA, M.R. Boldine improves endotelial function in diabetic db/db mice through inhibition of angiotensin II-mediated BMP4-oxidative stress cascade. **Br J Pharmacol**, v.170, p.1190-1198, 2013.
- LAU, Y.S; LING W.C.; MURUGAN, D.; MUSFATA, M.R. Boldine Ameliorates Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction: Therapeutic Implication for Hypertension and Diabetes. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.65, n.4, p.297-298, 2015.
- LEICHTER, J.; LEE, M. Does dehydration contribute to retarded fetal growth in rats exposed to alcohol during gestation? **Life Sci.** v. 35, p. 2105-2111, 1984.
- LEMONICA, I.; SANSEVERINO, M.; SPRITZER, D.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos**. Manual de teratogênese. Porto Alegre. UFRGS, p.19-39, 2001.
- LEON, M.; MOLTZ, H. Maternal Pheromone: discrimination by pre-weanling albino rats. **Physiology and Behavior**: p.265-267, 1971.

L'EVY-APPERT-COLLIN, M.C.; L'EVY, J. Sur quelques préparations galéniques de feuilles de boldo (*Peumus boldus*, momiacées). **J. Pharm. Belg.** v.32, p.13–22, 1977.

LONSTEIN, J.S., et al., Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. **Neuroscience**, v.82, n.1, p. 267-81, 1998.

NISHA S. D.; RAMANAN, M.; PARAGI-VEDANTHI, P.; DOBLE, M. Phytochemicals as multi-target inhibitors of the inflammatory pathway- A modeling and experimental study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.484, p.467-473, 2017.

MAGISTRETTI, M.J. Remarks on the pharmacological examination of plant extracts. **Fitoterapia**. v. 51, p.67-79, 1980.

MARTÍNEZ, J.; RÍOS, L.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M.J. Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzylisoquinoline alkaloids, **Free Rad. Biol. Med.**, v.12, p.287, 1992.

MAVOURNIN, K.H.; BLAKELEY, D.H.; CIMINO, M.C.; SALAMONE, M.F.; HEDDLE, J.Á. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Res.** v.239, p.29-80, 1990.

MEANEY, M. J.; BHATNAGAR, S.; LAROCQUE, C. K.; MCCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V.; PLOTSKY, P. M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Annals New York Academy of Science**, v.697, p.70-85, 1993.

MELLO, M.S.C. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifênil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos**. 131f. Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ, 2007.

MENGUE, S.S.; SCHENKEL, E.P.; MENTZ, L.A.; SCHMIDT, M.I. Especies vegetales utilizadas por embarazadas con el objeto de provocar la menstruación (Encuesta a siete ciudades de Brasil). **Acta Farmacéutica Bonaerense**. v.16, n.2, p.251-8, 1997.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais a gravidez. In: Anseverino ATV, Spreitzer DI, Schüler-Faccini L. **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Editora da Universidade; p.422-50, 2001.

MOORE, C. L.; MORELLI, G.A. Mother rats interact differently with male and female offspring. **Journal of Comparative Physiological Psychology**, v. 93, n.4, p.677-684, 1979.

MOORE, C. L. The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis. **Annals New York Academy of Sciences**, v.662, p.160-177, 1992.

MOORE, C.L.; POWER, K.L. Variations in maternal care and individual differences in play, exploration, and grooming of juvenile Norway rat offspring. **Development Psychobiology**, v.25, n.3, p.165-182, 1992.

MORELLO, A., LIPCHENCA, I.; CASSELS, B.K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. **Comp. Biochem. Physiol.** v.107, p.367-71, 1994.

MOREIRA, R.R.; CARLOS, I.Z.; VILEGA, W. Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. **Biol. Pharm. Bull.**, v.24 p.201–204, 2001.

MORENO, P.R.H.; VARGAS, V.M.F.; ANDRADE, H.H.R.; HENRIQUES, A.T.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. **Mutation Res.** v.260, p.145-52, 1991.

MURRAY, L.; COOPER, P. J. Postpartum depression and child development. **Psychological medicine**, v.27, n.2, p.253-260, 1997.

- NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature reviews. Neuroscience**, v.2, n.2, p.119–28, 2001.
- NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature neuroscience**, v.8, n.11, p. 1445–9, 2005.
- NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. **Plantas Mediciniais. Guia para o Profissional da Saúde**. Editorial Premier, São Paulo, 2002.
- OECD. **The Validation of Test Methods Considered for Adoption as OECD Test Guidelines**, O. f. E. C.-o. a. D. OECD. Paris, ENV/MC/CHEM, v.98, n.6, 1998.
- NUMAN, M. Maternal behavior. **The Physiology of Reproduction**, N. J. Knobil E. New York, Raven Press, p.221–302, 1994.
- NUMAN, M. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. **Dev Psychobiol**. v.49, n.1, p.12-21, 2007.
- NUMAN, M.; et al. The effects of D1 or D2 dopamine receptor antagonism in the medial preoptic area, ventral pallidum, or nucleus accumbens on the maternal retrieval response and other aspects of maternal behavior in rats. **Behav Neurosci**. v.119, n.6, p.1588-604, 2005.
- O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-Biological Interactions**, v.159, n.1, p.1-17, 2006.
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 416, **Two Generation Reproduction Toxicity Study**, 2001b.
- PARIS, R.R.; MOYSE, H. **Précis de Matière Médicale**, Tome II, Masson Ed., Paris, 1967.
- PLANCHON, L.; BRETIN, P; MANCEAU, P. **Précis de Matière Médicale**, Tome I, 5 ed., Libr. Maloine, Paris, 1946.
- PDR for herbal Medicines. 2 ed., **Medical Economics Company**, New Jersey, 2000.
- PENTEADO, S. H. et al. Prenatal lipopolysaccharide disrupts maternal behavior, reduces nest odor preference in pups, and induces anxiety: studies of F1 and F2 generations. **Eur J Pharmacol**, v.738, p.342-51, 2014.
- PEREIRA, M.; FERREIRA, A. Demanding pups improve maternal behavior impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. **Behavioural Brain Research**. v.175, p.139-148, 2006.
- QUEZADA, M., et al. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves, **J. Food Sci**. v.69, p.371–376, 2004.
- REISBICK, S.; ROSENBLATT, J.S.; MAYER, A.D. Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat. **Journal of Comparative Physiological Psychology**, p.722-732, 1975.
- RÍOS, J.L.; CHOLBI, R.; HUGUET, A.I.; MORA, A.; MAÑEZ, S.; PAIA, M.; ALCARAZ, M.J. **Planta Med.**, v.56, p.645–6, 1990.
- SAN MARTÍN, J.; U. D. **Studios Botánicos**, v.17, p.109-18, 1998.
- SANTANAM, N.; PENUMETCHA, M.; SPEISKY, H.; PARTHASARATHY, S. A novel alkaloid antioxidant, Boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL in-vitro and atherosclerosis in vivo in LDLR–/– mice. **Atherosclerosis**. v.173, p.203–210, 2004.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN G.; RODRIGUEZ JA.; THEODULOZ C.; et al. Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. (“Boldo”). **Radic Res**, v.37, p.447–452, 2003.

- SI, Y. *et al.*. Effects of boldine on tyrosinase: Inhibition kinetics and computational simulation. **Process Biochemistry**. v.48, p.152–161, 2013
- SOUZA, F.L.; LAZZARI, V.; AZEVEDO, M.S.; ALMEIDA, S.; SANVITTO, G.L.; LUCION, A.B.; GIOVENARDI, M. Progesterone and maternal aggressive behavior in rats. **Behavioural Brain Research**. v.212, p.84-89, 2010.
- SOUZA, M.A.; SZAWKA, R.E.; CENTENARO, L.A.; DIEHL, L.A.; LUCION, A.B. Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. **Physiology & Behavior**. v.105, p.850-855, 2012.
- STANDAERT, D.G.; GALANTER, J.M. Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. In: Golan, D.E., TASHJIAN, A.H., ARMSTRONG, E.J., ARMSTRONG, A.W. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.188-207, 2013.
- RANKIN, M.L.; HAZELWOOD, L.A.; FREE, R.B.; NAMKUNG, Y.; REX, E.B.; ROOF, R.A.; SIBLEY, D.R. Molecular pharmacology of the dopamine receptors. In: IVERSEN, L.L.; DUNNETT, S.B.; IVERSEN, S.D.; BJORKLUND, A. **Dopamine Handbook**. Nova Iorque: Oxford University Press, p.63–87, 2010,
- RATES, S.M.K. Uso racional de fitoterápicos. **Revista Afarg**s. Edição especial, 2001.
- SCHWANZ, M.; NUNES, E.; VIGNOLI-SILVA, M.; HENRIQUES, A. T.; KONRATH, E. L.; VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. **Caracterização Farmacobotânica de *Peumus boldus* (Monimiaceae) e Avaliação de Atividades Biológicas do Alcalóide Boldina**. TC - 062, 2010.
- SCOTT, J. P. Critical periods in behavior development. **Science**, v.138, p.949-958, 1962.
- SILVA, M. R. P.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Effects of dopamine receptor antagonists on ongoing maternal behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.68, n.3, p.461-468, 2001.
- SOUSA, N.; LUKOYANOV, N. V.; MADEIRA, M. D.; ALMEIDA, O. F. X.; BARBOSA, M. M. P. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. **Neuroscience**, v.97, n.2, p.253-266, 2000.
- PHILIPPOV, S.; IVANOVSKA, N.; NIKOLOVA, P. Glucine analogues as inhibitors of mouse splenocyte activity. **Pharmazie**, v.53, p.694–698, 1998.
- SPEISKY, H.; SQUELLA, J.; NÚÑEZ-VERGARA, L. . Actity of boldine on rat eleum. **Planta Med.** 57: 519–522, 1991.
- SPEISKY, H.; CASSELS, B.K.; LISSI, E.; VIDELA, L. Antioxidant properties of the alkaloid boldine in systems undergoing lipid peroxidation and enzyme inactivation. **Biochem. Pharmacol**, v.41 p.1575–1581, 1991.
- SPEIKY, H.; ELLAHUEÑE, M.; COFRÉ, S.; NÚÑES-VERGARA, L.J.; DE LA FUENTE, N. Evaluation of the lethality and genotoxicity of boldine in mice. **Mutation Res**. Submitted,1993.
- SPEISKY, H.; CASSELS, B. K. **Pharmacol. Res.** 29: 1-11, 1994.
- SPEISKY, H.; CASSELS, B. K. **Boldo e Boldina: um caso emergente de desenvolvimento medicamentoso natural**. Universidade do Chile, TC - 064,2010.
- SPETHMANN, C.N. **Medicina Alternativa de A a Z**. Ed. Natureza. 2003.
- STERN, J. M.; JOHNSON, S.K. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. **Physiology and Behavior**, 993-1011, 1990.

STERN, J.M.; KEER, S.E. Maternal motivation of lactating rats is disrupted by low dosages of haloperidol. **Behav Brain Res.** v.99, n.2, p.231-239, 1999.

TAVARES, D.C.; TAKAHASHI, C.S. Evaluation of the genotoxic potential of the alkaloid boldine in mammalian cell systems in vitro and in vivo. **Mutat. Res.** v.321, p.139-145, 1994.

THE REVIEW OF NATURAL PRODUCTS. **Facts and Comparisons**, 2 ed, St. Louis, 2002.

TIEPPO, C.A.; et al. Opposite modulation of apomorphine- or amphetamine-induced stereotypy by antagonists of CCK receptors. **Eur J Pharmacol.** v.387, n.2, p.189-96, 2000.

UBEDA, A.; MONTESINOS, C.; PAIA, M.; ALCARAZ, M.J. **Free Rad. Biol. Med.** v.15, p.159-67, 1993.

URZÚA, A.; ACUÑA, P. **Fitoterapia**, v.54, p.175-7, 1983.

WALSTAB, J.; WOHLFARTH, C.; HOVIUS, R.; SCHMITTECKERT, S.; OTH, R.R.; LASITSCHKA, F.; WINK, M.; ONISCH, H. B.; NIESLER, B. Natural compounds boldine and menthol are antagonists of human 5-HT₃ receptors: implications for treating gastrointestinal disorders. **Neurogastroenterol Motil**, v.26, p.810-820, 2014.

WEIER, K.M.; BEAL, M. Complementary therapies as adjuncts in the treatment of postpartum depression. **J Midwifery Womens Health.** v.49, n.2, p.96-104, 2004.

WEINBERG, J.; SLIWOWSKA, J. H.; LAN, N.; HELLEMANS, K. G. C. Prenatal Alcohol Exposure: Foetal Programming, the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Sex Differences in Outcome. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, p. 470-488, 2008.

WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. **The behavior of the laboratory rat**. Oxford: Oxford University press. 2005.

WHO. **Organización Mundial de la Salud Ginebra**. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. 2005.

WINK, M. Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels. In: Atta-ur-Rahman, ed. Studies in Natural Products Chemistry; **Bioactive Natural Products**. Amsterdam: Elsevier, v.21, n.B, p.3-129, 2000.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégia após a “Era do Teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.3, n.2, p.93-98, 2006.

VAN OERS, H. J.; DE KLOET, E. R.; WHELAN, T.; LEVINE, S. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. **The Journal of Neuroscience**, v.18, n.23, p.10171-10179, 1998.

VEIGA JUNIOR, V. F. d. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.308-313, 2008.

VEIGA, C. P.; MICZEK, K. A.; LUCION, A. B.; ALMEIDA, R. M. M. de. Effect of 5-HT_{1B} receptor agonists injected into the prefrontal cortex on maternal aggression in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, n.6, p.825-830, 2007.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Behavioural Brain Research**, v.263, n.0, p.190-197, 2014.

YOUN, Y.; KWON, O.; HAN, E.; SONG, J.; SHIN, Y.; LEE, C. **Biochem. Pharmacol.** v.63, p.495-505, 2002.

YU, B.; COOK, C.; SANTANAM, N. The Aporphine Alkaloid Boldine Induces Adiponectin Expression and Regulation in 3T3-L1 Cells. **Journal Of Medicinal Food**, v.12 n.5, p.1074-1083, 2009.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: A risk of assessment approach. In: **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1989.

ZETLER, G. Neuropeptide-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of apomorphine alkaloids:bulbocapnine, corutuberine, boldine and glaucine **Arch. Int. Pharmacod. Ther.** 296: 255-81, 1988.