

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA PREPARAÇÃO FITOTERÁPICA CONTENDO
Piper methysticum FORST, PIPERACEAE (kava kava®) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL EM RATOS WISTAR**

Viviane Machado Pinto
Orientação: Dr. João Roberto Braga de Mello

Porto Alegre, 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA PREPARAÇÃO FITOTERÁPICA CONTENDO
Piper methysticum FORST, PIPERACEAE (kava kava®) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL EM RATOS WISTAR**

Autora: Viviane Machado Pinto
Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
farmacologia .
Orientador: Dr. João Roberto Braga de Mello

Porto Alegre, 2004

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador João Roberto Braga de Mello pela paciência, dedicação, exigência e incentivo no decorrer deste trabalho.

Ao professor Augusto Langeloh e professora Eliane Dallegrave pelos conselhos sábios no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor de Hélio que foi fundamental na realização da estatística deste trabalho.

À Vanessa e Bea, pela amizade e por estarem sempre dispostas a me ajudar no que fosse necessário.

Às amigas Mariângela, Rose e Eugênia que além de auxílio na execução dos experimentos estavam sempre presentes nas horas mais difíceis.

Ao meu marido, André, pelo amor, amizade e paciência para suportar os momentos de ausência.

Ao meu irmão que estava sempre disposto a me ajudar no que fosse necessário.

À minha família, em especial minha mãe que sempre me apoiou e torceu por mim e minha dinda Irene que esteve sempre presente com seu otimismo, bom humor e “lanchinhos”.

Às colegas e amigas da ULBRA, Jussara, Virgínia, Beatriz e Cristine e Karine que me apoiaram e sempre me incentivaram a seguir em frente.

SÚMÁRIO

LISTADE TABELAS.....	06
LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE ABREVIATURAS.....	09
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Fitoterápicos.....	16
2.1.1 <i>Piper methysticum</i> Forst, Piperaceae (kava kava).....	19
2.2 Toxicidade reprodutiva	26
2.2 Toxicidade hepática	30
3 OBJETIVOS.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Toxicidade reprodutiva do <i>Piper methysticum</i> Forst, Piperaceae (kava kava®).....	35
4.1.1 Animais.....	35
4.1.2 Acasalamento.....	35
4.1.3 Preparação fitoterápica testada.....	36
4.1.4 Tratamento dos animais.....	36
4.1.5 Variáveis avaliadas.....	37
4.1.5.1 Ratas.....	37
4.1.5.2 Avaliação dos fetos e órgãos das ratas.....	38
4.1.5.3 Método de diafanização e coloração.....	39
4.1.6 Avaliação dos índices reprodutivos.....	40
4.1.7 Avaliação dos índices fetais.....	40
4.1.8 Dosagem de enzimas hepáticas e histopatologia do fígado.....	41
4.1.9 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Toxicidade reprodutiva do <i>Piper methysticum</i> Forst, Piperaceae (kava kava®).....	43
5.1.1 Desenvolvimento ponderal das ratas durante a prenhez.....	43
5.1.2 Consumos relativos de água durante a prenhez.....	45
5.1.3 Consumos relativos de ração durante a prenhez.....	47
5.1.4 Índices reprodutivos.....	48
5.1.5 Massa relativa dos órgãos.....	49
5.1.6 Índices dos fetos.....	49
5.1.7 Anormalidades esqueléticas dos fetos.....	51
5.2 Toxicidade hepática.....	57

6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Massa corporal média (\bar{x}) em gramas e erro padrão da média (epm) das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}); e tratadas com <i>P.methysticum</i> DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação.....	45
TABELA 2	Média (\bar{x}) e erro padrão da média (epm) do consumo de água (ml), medida a cada 3 dias nos grupos controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com <i>P. methysticum</i> DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação.....	47
TABELA 3	Média (\bar{x}) e erro padrão da média (epm) do consumo de ração (g), medida a cada 3 dias nos grupos controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com <i>P. methysticum</i> DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação.....	47
TABELA 4	Índices reprodutivos das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com <i>P. methysticum</i> DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação.....	49
TABELA 5	Massa relativa dos órgãos das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com <i>P. methysticum</i> DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação.....	50
TABELA 6	Índices dos fetos das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com <i>Piper methysticum</i> DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação	51
TABELA 7	Prevalência das anormalidades esqueléticas (variações) dos fetos das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com <i>P. methysticum</i> DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação...	52
TABELA 8	Prevalência das anormalidades esqueléticas (malformações) dos fetos das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com <i>Piper methysticum</i> DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação.....	53
TABELA 9.	Níveis séricos da atividade da FA e ALT das ratas grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com <i>P.methysticum</i> DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Arbusto de <i>P. methysticum</i> Forst. Disponível em: < http://kavaroot.com/index.htm >. Capturado 10 de maio 2004.....	20
FIGURA 2	Raiz triturada de <i>P. methysticum</i> Forst. Disponível em < http://www.gpo.org.th/rdi/Netzine/V3N30/kava.htm > Capturado 10 de maio 2004.....	20
FIGURA 3	Estrutura química das cavalactonas de maior relevância farmacológica. Capturado 05 de jun. 2004. Disponível em: < http://www.erowid.org/plants/Kava/Kava.chemistry2.shtml >	21
FIGURA 4	Desenvolvimento ponderal relativo (1° dia = 100%) das ratas do grupo controle (0mg.kg ⁻¹); e tratadas com <i>P. methysticum</i> DH (5mg.kg ⁻¹); DHx7 (35mg.kg ⁻¹) e DHx10 (50mg.kg ⁻¹) entre o 6° e o 15° dia de gestação. Dados expressos pela média	44
FIGURA 5	Consumo relativo de água das ratas do grupo controle (0mg.kg ⁻¹); e tratadas com <i>P. methysticum</i> DH (5mg.kg ⁻¹); DHx7 (35mg.kg ⁻¹) e DHx10 (50mg.kg ⁻¹) entre o 6° e o 15° dia de gestação. Dados expressos pela média.....	46
FIGURA 6	Consumo relativo de ração (g) das ratas do grupo controle (0mg.kg ⁻¹); e tratadas com <i>P.methysticum</i> DH (5mg.kg ⁻¹); DHx7 (35mg.kg ⁻¹) e DHx10 (50mg.kg ⁻¹) entre o 6° e o 15° dia de gestação. Dados expressos pela média.....	48
FIGURA 7	Fetos diafazinados de progenitoras do grupo controle e tratados com <i>P.methysticum</i> . Figura A: feto do grupo controle demonstrando fontanela normal. Figura B: feto do grupo DHx10 demonstrando fontanela aumentada.	54
FIGURA 8	Fetos diafazinados de progenitoras do grupo controle e tratados com <i>P.methysticum</i> . Figura A: Feto do grupo controle apresentando costelas de formato normal. Figura B: Costelas normais em detalhe. Figura C: Feto do grupo DHx10 apresentando costelas onduladas. Figura D: Costelas onduladas em detalhe.....	55
FIGURA 9	Feto diafanizado do grupo tratado com <i>P. methysticum</i> DHx10 apresentando ossificação incompleta do crânio.....	56

FIGURA 10. Fetos diafazinados de progenitoras do grupo controle e tratados com *P.methysticum*. Figura A: Feto do grupo controle apresentando ossificação completa das esternibras. Figura B: Feto do grupo DHx10 apresentando ossificação incompleta das esternibras.....

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina-aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVMA	<i>American Veterinary Medical Association</i> - Associação Americana de Medicina Veterinária
°C	Graus Celsius
COBEA	Colégio Brasileiro de Bem Estar Animal
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação Animal
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> - Agência de Proteção Ambiental
epm	Erro padrão da média
FA	Fosfatase alcalina
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> - Administração de Drogas e Alimentos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
°GL	Graus <i>Gay Lussac</i>
h	Horas
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
kg	Quilograma (s)
LTDA	Limitada
MAAs	Membros anteriores
mg	Miligrama (s)
ml	Mililitro (s)
MPs	Membros posteriores
N°	<i>Número</i>
Na	<i>Sódio</i>
OECD	Organização para o desenvolvimento e cooperação econômica - <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>

<i>p</i>	Probabilidade, nível de significância alcançado
<i>SNC</i>	Sistema Nervoso Central
Tx	Taxa
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VO	Via oral
%	Porcento

RESUMO

A kava kava (*Piper methysticum* Forst), pertencente à família Piperaceae, é utilizada para diminuir a ansiedade e medo e tratar distúrbios comportamentais. É um fitoterápico utilizado em vários países, entretanto pouco se sabe, sobre seus efeitos no desenvolvimento embrionário. O presente trabalho avaliou o possível efeito teratogênico da formulação fitoterápica contendo *Piper methysticum* Forst durante o período de organogênese em ratas Wistar. As ratas foram tratadas com 0mg.kg^{-1} (controle), 5mg.kg^{-1} ; 35mg.kg^{-1} e 50mg.kg^{-1} da preparação fitoterápica (kava kava®), por via oral, do 6º ao 15º dia de prenhez. Os resultados revelaram ausência de toxicidade sistêmica e reprodutiva nas variáveis avaliadas, fundamentados pela ausência de alterações no desenvolvimento ponderal, consumos de ração e água, na massa relativa dos órgãos, nas reabsorções embrionárias, na massa corporal, na vitalidade, no número de fetos por progenitora e nas alterações macroscópicas externas e esqueléticas dos fetos. Adicionalmente as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) foram determinadas no soro das ratas tratadas, para avaliar o possível efeito hepatotóxico da preparação fitoterápica. Não houve alteração na atividade das enzimas ALT e FA, bem como alterações histopatológicas do fígado das ratas, não confirmando a hepatotoxicidade. Conclui-se que o fitoterápico kava kava, até 35mg.kg^{-1} , não determina o aparecimento de teratogenicidade.

ABSTRACT

The kava kava (*Piper methysticum* Forst), belongs to Piperaceae family, is used to reduce anxiety and fright and to treat behavior disturbs. In spite of the phytoterapeutic use in several countries. The effects on embryonic development is not know. The present study evaluated the possible teratogenic effects of the phytotherapeutic formulation that contains *Piper methysticum* Forst (kava kava®) during the organogenesis period in Wistar rats. The rats were treated with 0mg.kg⁻¹ (control), 5mg.kg⁻¹, 35mg.kg⁻¹ and 50mg.kg⁻¹ of the phytotherapeutic preparation, through oral tract, from day 6 up to day 15 of pregnancy. The results showed absence of systemic and reproductive toxicity on the evaluated variables, since there were no changes on weight development, food and water consumption, on relative organs mass, on embryonary reabsorptions, on body mass, on vitality, on fetus number and on external macroscopical and skeletal abnormalities of the fetus. In addition the alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP) were determined on the serum of treated female rats, to evaluate the possible hepatotoxic effect of the phytotherapeutic preparation. No changes on ALT and AP enzymes were observed, as well as histopathologic changes on rats liver, not confirming the liver toxicity. As conclusion, the kava kava phytotherapeutic, up to 35mg.kg⁻¹, doesn't determine teratogenic effects.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de extratos vegetais com fins terapêuticos (fitoterápicos), tem sido crescente tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (SHARAPIN, 1996). Acredita-se que uma das razões para esta crescente popularidade da utilização dos fitoterápicos na medicina humana, seja pela falsa idéia de que os medicamentos a base de vegetais não possuem toxicidade (HAMID et al., 1997).

Na medicina veterinária tem ocorrido um aumento do interesse por tratamentos alternativos, tanto por parte de veterinários como dos proprietários de pequenos animais. A Associação Americana de Medicina Veterinária (*American Veterinary Medical Association-AVMA*) reconhece a acupuntura veterinária, a terapia física, a massagem veterinária, bem como a homeopatia veterinária, a medicina holística veterinária, e a fitoterapia veterinária como alternativas terapêuticas (SCHWARTZ, 2000).

A kava kava (*Piper methysticum* Forst), é um fitoterápico, pertencente à família das Piperaceae que tem sido cultivado por mais de 3000 anos por todo sul do Pacífico e norte do Havai. É comercializado em vários países, sendo conhecido como kava kava, awa, kava, yangona (BASKO, 2002). É indicado tanto em casos de ansiedade e insônia (SIMÕES, 2001) como calmante, para induzir o relaxamento, tratamento de asma, reumatismo, para promover perda de peso, entre outros (SINGH, 1992). Os medicamentos preparados com *P. methysticum* têm eficácia ansiolítica sem apresentar os mesmos efeitos adversos dos benzodiazepínicos, como prejuízo das funções cognitivas, sonolência e redução da coordenação motora (TYLER & ROBBERS, 2000).

Os distúrbios da ansiedade estão cada vez mais freqüentes nos consultórios médicos. Em humanos acredita-se que possa vir a substituir a depressão, que é a mais comum das doenças psiquiátricas (HAYES & KIRKWOOD, 1992). Assim como em humanos, os distúrbios de

ansiedade e alterações comportamentais, como angústia por ficar sozinho, agressividade, excitação excessiva, estão se tornando rotina na clínica de pequenos animais. Para o tratamento desses distúrbios, a medicina tem buscado tratamentos alternativos, como o uso de fitoterápicos. Espécies de plantas como a camomila, kava kava, erva de St. John's, ginseng, ginkgo biloba e valeriana são associadas com o crescimento do número de estudos clínicos que investiguem seus valores terapêuticos nos distúrbios psiquiátricos em pessoas. Produtos contendo essas plantas estão disponíveis em farmácias e lojas de produtos nutricionais (*health foods stores*) nos Estados Unidos. Entretanto, essas preparações variam em suas concentrações, dosagens, efeitos colaterais e interações com outras drogas (SCHWARTZ, 2000).

Apesar das plantas medicinais serem utilizadas em pequenos animais, muitas não apresentam dosagens estabelecidas para uso em pacientes não humanos. Tem se provado que a Ginkgo biloba é benéfica em cães diagnosticados com a síndrome da disfunção cognitiva canina e em gatos velhos com excessiva vocalização com causa não identificada. A raiz da valeriana é utilizada como hipnótico e ansiolítico, podendo ser útil, entre outras, no controle de um grande número de casos de ansiedade ou medo, como o medo de trovoadas e outras fobias de barulhos, assim como andar de carro e ansiedade por separação (SCHWARTZ, 2000).

O magnetismo do rótulo de um produto indicando que seus componentes são “naturais” é evidente. Entretanto, “natural” não garante que o produto é benéfico ou seguro. Segundo Ernst (2002a), efeitos colaterais têm sido relatados com o uso de algumas plantas como é o caso da erva de St. John's (*Hypericum perforatum* L.), indicada como antidepressiva, que pode causar fotosensibilização em pessoas e em alguns animais. Um outro exemplo é o ginseng (*Panax ginseng*), indicado como afrodisíaco, antidepressivo e diurético, podendo apresentar como efeitos adversos, diarreia, hiper ou hipotensão, náusea, excitação. Segundo Dantas (2004), algumas espécies de plantas são reconhecidas pela sua alta toxicidade e conseqüentemente um potencial abortivo, como a espirradeira (*Nerium oleander* L.) e a comigo-ninguém-pode (*Dieffenbachia picta* Shott). Outras espécies são usadas no meio popular habitualmente, na maioria das vezes, sem ter o conhecimento que podem levar ao aborto ou anomalias congênitas, se forem consumidas durante a gravidez. Dentre estas podemos citar: artemísia (*Artemisia vulgaris* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), erva moura (*Solanum americanum* Mill.), melão de São

Caetano (*Momordica charantia* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* sp.), arruda (*Ruta graveolens* L.), boldo (*Peumus boldus* Mol.).

Wong (1979), cita que em vários anos de observação da prescrição de plantas medicinais para os habitantes de Singapura, trouxe a tona o uso de certas plantas como principais medicamentos para mulheres gestantes, mesmo não sabendo sobre os efeitos específicos dessas plantas, mas levando em consideração os possíveis benefícios psicossomáticos. Todavia, não é possível esquecer que, os princípios ativos das plantas podem atravessar a placenta, chegar no feto podendo levar a malformações. A kava kava é um fitoterápico com ação ansiolítica e sedativa, que normalmente é utilizada por períodos de até três meses. Na literatura não existem estudos controlados na gravidez e, portanto, é prudente evitar o uso da kava kava neste período (KAVA, 2001).

Recentemente o *P. methysticum* foi associado a casos de hepatotoxicidade na Suíça e Alemanha (SINGH; DEVKOTA, 2003). Estes casos incluem hepatite, cirrose e insuficiência hepática. Estes fatos conduziram a retirada , no mercado francês, alemão e suíço, de todos os produtos contendo *P. methysticum*, até que se tenham estudos mais específicos. Nos EUA foi solicitado que consumidores e médicos informassem sobre qualquer efeito adverso da kava kava (FDA, 2002). No Brasil, foi indicada uma mudança nas embalagens de produtos contendo o *P. methysticum*, na qual deve ser incluída a frase : “Venda sob prescrição médica” (BRASIL, 2002).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade reprodutiva da preparação fitoterápica contendo *P. methysticum* (kava kava®), do laboratório Herbarium, utilizada em humanos e recentemente em animais de companhia, avaliando-se os efeitos da exposição, de ratas Wistar, durante a fase de organogênese. Além disso, devido a recentes relatos de hepatotoxicidade associados ao uso de kava kava, realizou-se uma avaliação hepática por meio de dosagem das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) e histopatologia do fígado das ratas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fitoterápicos

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vinculada ao Ministério da Saúde define um produto fitoterápico como um medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnicocientíficas em publicações de ensaios clínicos (BRASIL, 2004b).

Segundo a Portaria ou resolução RE nº 90 da ANVISA, os estudos de toxicidade dos fitoterápicos devem ser conduzidos com amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido. Deve ser realizado o teste de toxicidade aguda, no qual ocorre a avaliação da toxicidade após exposição a uma dose única ou fracionada administrada no período de 24 horas, e adicionalmente pode ser necessário o teste de toxicidade de doses repetidas (longa duração), no qual devem ser utilizadas, pelo menos, duas espécies de mamíferos, sendo uma roedora e uma não-roedora. Devem ser utilizados machos e fêmeas, adultos jovens. Os grupos experimentais devem ser compostos por pelo menos 10 animais devendo incluir um grupo controle com o veículo da formulação. O estudo deve ser realizado utilizando no mínimo três doses do medicamento fitoterápico (BRASIL, 2004c).

Relatos de riscos hepáticos, como hepatite, cirrose e insuficiência hepática, têm sido associados ao uso de kava kava, fato este que levou a retirada do mercado alemão, suíço, francês, canadense e do Reino Unido de produtos que apresentassem *P. methysticum* em sua formulação, desde dezembro de 2001, para maiores investigações. Apesar dos danos hepáticos serem considerados raros, nos Estados Unidos a FDA acredita que os consumidores deverão ser

informados sobre este risco, e recomenda que os consumidores de kava kava e os médicos que receitem estes suplementos dietéticos, relatem qualquer caso de alterações hepáticas tanto os sintomas específicos como icterícia e urina marrom, como os sintomas inespecíficos como náuseas, vômitos e dores abdominais (FDA, 2002).

No Brasil, após relatos mundiais de hepatotoxicidade relacionados ao uso da kava kava, foi determinada a apreensão, em todo o território nacional, de qualquer produto farmacêutico a base de *Piper methysticum*, que não possua tarja vermelha contendo os dizeres “Venda sob prescrição médica”, ou que não possuam registro (BRASIL, 2002).

A legislação e regulação das plantas medicinais são carentes em muitos países. Nos EUA, por exemplo, as plantas medicinais são classificadas como suplementos nutricionais sendo isentos de informação ou declaração de sua eficácia terapêutica nos rótulos dos produtos, de acordo com a legislação de 1994. Mediante comprovação de toxicidade, a FDA pode determinar a retirada de produtos contendo o *P. methysticum* do mercado. A classificação de suplementos nutricionais tem trazido alguns problemas para o Brasil pois, a legislação brasileira em vigor, para os alimentos, permite a entrada no País, sem registro, de alimentos importados em suas embalagens originais. Isto tem permitido a entrada, no Brasil, de centenas de suplementos nutricionais que, aqui, são comercializados efetivamente como medicamentos, mas não obedecem às normas brasileiras dessa classe de produtos. Para tentar solucionar este problema foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pela Lei nº9782, de 26 de janeiro de 1999. Em seu artigo 42, a Lei alterou o artigo 57 do Decreto-Lei nº 986/69, submetendo a importação de alimentos, aditivos e outras substâncias relacionadas às suas exigências, o que amplia a possibilidade de intervenção mais efetiva nesse problema envolvendo fitoterápicos importados como alimentos. No entanto, a aplicação prática deste expediente ainda deixa muito a desejar (MARQUES & PETROVICK, 2002).

No Reino Unido, muitas plantas medicinais são vendidas de acordo com as normas dos alimentos de 1990 (*Food Act*), com a exceção de alguns remédios tradicionais que são registrados de acordo com as normas dos medicamentos de 1968 (*Medicine Act*). Entretanto, alguns países da

Europa, como a Alemanha, a França e Suíça têm implementado estratégias para o licenciamento das plantas medicinais (Herbal Medicine, 2003).

No Brasil, de acordo com a Resolução nº 89 foi criada uma Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos. Nesta lista são encontradas a nomenclatura botânica, o nome popular, a parte usada, a padronização, formas de uso, indicações e ações terapêuticas, dose diária via de administração e restrição de uso. As plantas que estiverem nesta lista, não necessitam de comprovações. As plantas que não estiverem na lista de registro simplificado de fitoterápicos deverão seguir a Resolução nº 48, na qual os medicamentos fitoterápicos deverão apresentar segurança de uso e as indicações terapêuticas deverão ser avaliadas através de uma das três opções:

- 1) Atingir no mínimo 6 pontos, com estudos publicados entre as obras da “Lista de Referências Bibliográficas para Avaliação de Segurança e Eficácia de Fitoterápicos” (RE nº 88), conferidos de acordo com a escala:
 - a) Três (3) pontos a cada inclusão em obra relacionada no Grupo I
 - b) Dois (2) pontos a cada inclusão de obra relacionada no Grupo II
 - c) Um (1) ponto a cada inclusão em obra relacionada no Grupo III
 - d) Meio (0,5) ponto a cada inclusão em publicação técnico-científica, brasileira e/ou internacional, não incluídas nos Grupos I, II e III, que contenham informações relativas à segurança de uso e às indicações terapêuticas propostas. No mínimo 50% da pontuação obtida deverá originar-se de estudos em seres humanos.
- 2) Apresentar comprovação de segurança de uso através de testes (toxicologia pré-clínica, toxicologia clínica) e de eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica, farmacologia clínica) do medicamento. Os ensaios clínicos deverão atender às exigências estipuladas pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS), (RE nº90).
- 3) Apresentar um levantamento bibliográfico (etnofarmacológico e de utilização, documentações tecnicocientíficas ou publicações), que será avaliado consoante aos seguintes critérios: indicação de uso; coerência com relação às indicações terapêuticas propostas; ausência de risco tóxico ao usuário; ausência de grupos ou substâncias químicas tóxicas,

presentes dentro de limites comprovadamente seguros; comprovação de uso seguro por um período igual ou superior a 20 anos.

Caso o medicamento fitoterápico integre a última publicação da Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos, nas condições ali definidas, não há necessidade de validar as indicações terapêuticas e a segurança do uso (BRASIL, 2004a).

2.1.1 *Piper methysticum* Forst, Piperaceae (kava kava®)

O *Piper methysticum* Forst (pertencente à família Piperaceae) foi identificado pelo botânico Johann Gorg Adam Forster, nas ilhas do Sul do Pacífico, em 1771. É um arbusto perene que pode chegar a 3m de altura, apresenta folhas verdes com aproximadamente 15 a 20 cm de comprimento (Figura 1) (Rhizoma...,2004). É um fitoterápico usado em quase todas as ilhas do Oceano Pacífico, embora ocorra principalmente na Polinésia Ocidental, com exceção da Nova Zelândia, Nova Caledônia, e a maioria das ilhas Salomão (SINGH, 1992; NORTON & RUZE, 1994). Nos anos 80, também foi introduzido nas comunidades aborígenes da Austrália, onde se tornou uma droga de abuso, pela ausência de controle (SINGH, 1992). Originalmente, era usada apenas em ritos religiosos, com seu consumo limitado ao chefe e seus sacerdotes. A kava kava era ritualmente usada por jovens homens ou mulheres que cortavam e mastigavam pedacinhos da raiz e após cuspiam os pedaços dentro de uma vasilha onde era acrescentado o leite de coco ou água para fazer uma infusão. Entretanto, por razões sanitárias, a técnica de mastigação foi abandonada e optou-se por ralar ou triturar a raiz (Figura 2) (ROBBERS et al., 1996).

A kava kava é um dos nomes populares, mais utilizados, do *Piper methysticum* Forst, o qual possui aspectos sociais relevantes na Oceania, estando sempre presente em cerimoniais importantes (NORTON & RUZE, 1994). Apresenta também uma série de propósitos mágico-religiosos, sendo um dos mais importantes, o derrame da bebida em citação aos deuses (BRUNETON, 1993).



FIGURA 1. Arbusto de *P. methysticum* Forst
Disponível em:
<<http://kavaroot.com/index.htm>>.



FIGURA 2. Raiz triturada do *P. methysticum* Forst
Disponível em:
<www.gpo.org.th/rdi/Netzine/V3N30/kava.htm>

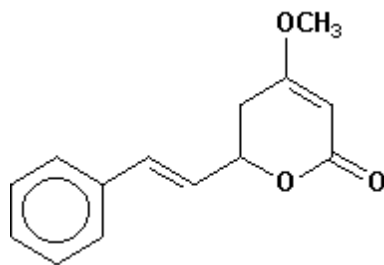
Além dos aspectos sociais, em muitas áreas do Pacífico acreditava-se que a kava kava tinha efeito benéfico sobre a saúde e por isso era usada para muitos fins, tais como: calmante, induzir o relaxamento, dormir para contrabalançar a fadiga, congestão no trato urinário, asma, reumatismo, para perder peso, entre outros (SINGH, 1992).

Basko (2004), alerta para a necessidade de pesquisas e experiências clínicas para descobrir a melhor forma de usar a kava kava na medicina veterinária. Ele utiliza o extrato seco da kava kava há mais de dez anos, utilizando para produzir o relaxamento muscular, para tratar problemas de ansiedade, utiliza como um anestésico tópico e como anticonvulsivante. Mais recentemente tem combinado a kava kava com outras plantas, vitaminas e minerais para o tratamento de desordens de ansiedade em cães, gatos e cavalos. Malsch e Kieser (2001) sugerem

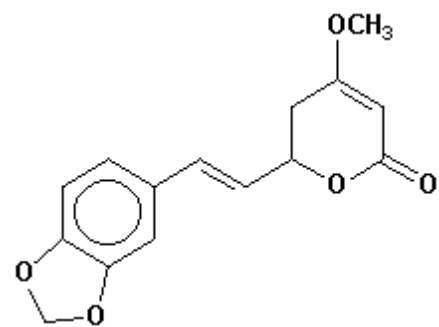
o uso do fitoterápico kava kava sozinho ou associado ao *Hypericum perforatum*, como ansiolítico e sedativo.

A maioria dos estudos realizados com a kava kava foi de duração média de 4 semanas, não sendo capaz de detectar efeitos adversos decorrentes do uso crônico. Porém Tyler & Robbers (2000) descrevem um ensaio clínico multicêntrico de longa duração (25 semanas), utilizando extrato de kava lipofílico contendo 70% de cavalactones, os pacientes recebiam 100 mg de extrato ou placebo três vezes ao dia. Os resultados deste estudo corroboram com os obtidos nos estudos de curta duração em relação à eficácia na ansiedade e boa tolerabilidade.

Como componentes ativos do *P. methysticum* Forst, foram identificadas dezoito cavalactonas, destas, seis têm maior relevância farmacológica: cavaína, iangonina, desmetoxiangonina, 7,8-di-hidrocavaína, metisticina e 7,8-di-hidrometisticina (Figura 3) (LECHTENBERG et al., 1999). Estudos farmacológicos tem demonstrado que as cavalactonas são mais ou menos potentes, sobre a atividade central e como relaxante da musculatura esquelética (ROBBERS, 2000). As cavalactonas contidas nas raízes do *Piper methysticum* podem variar significativamente de planta para planta (3-20%) dependendo do crescimento, colheita e condições de processamento (KAVA, 1988).



Cavaína



Metisticina

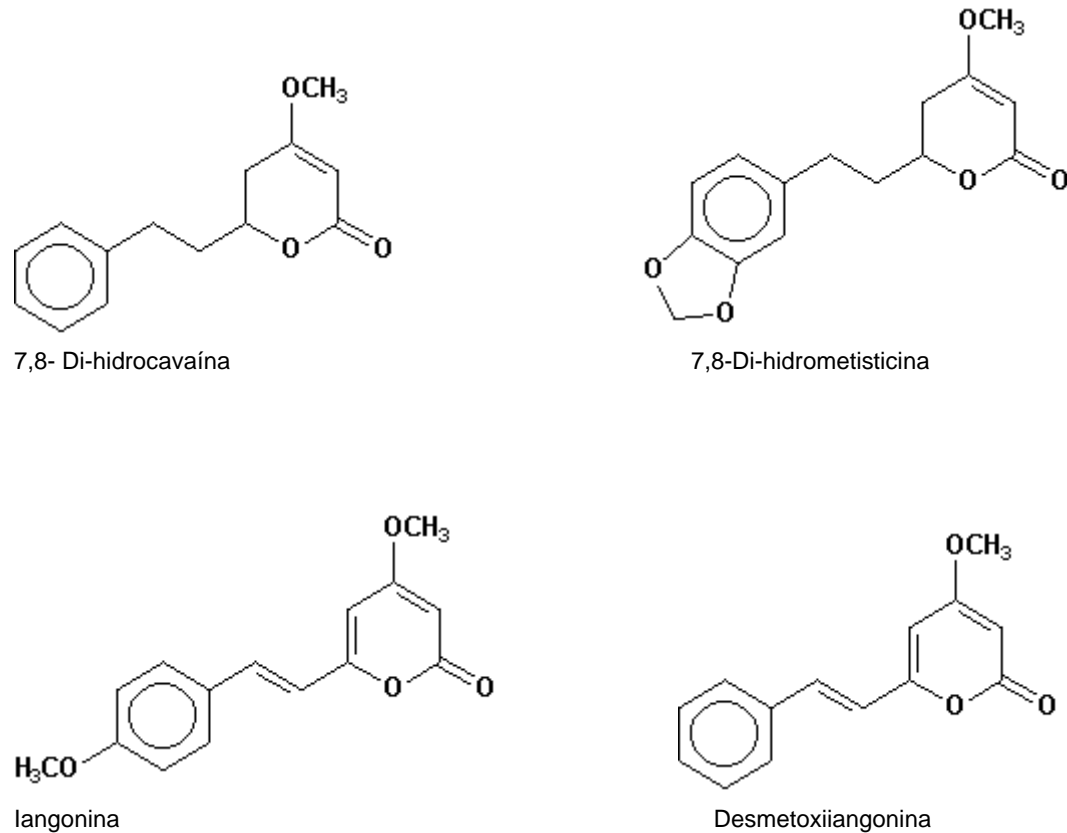


FIGURA 3. Estrutura química das cavalactonas de maior relevância farmacológica. Disponível em: <<http://www.erowid.org/plants/Kava/Kava.chemistry2.shtml>>

Produtos contendo extratos ou mesmo pó de raízes e rizomas de *P. methysticum* têm sido comercializados na Europa. Estudos farmacológicos em animais indicaram ação sedativa, relacionada com a ativação da transmissão dopaminérgica e serotoninérgica na região mesolímbica, o que estaria associado com a redução da excitabilidade emocional e alterações comportamentais. Como substâncias responsáveis pela atividade no sistema nervoso central (SNC), foram isoladas lactonas denominadas cavalactonas ou cavapironas. Posteriormente, foram desenvolvidas preparações enriquecidas com essas substâncias (teor no extrato bruto de 5 a 8% e, no extrato enriquecido, em torno de 70%). Estudos de biodisponibilidade foram realizados em animais, demonstrando a absorção e eliminação rápida das lactonas cavaína e di-hidrocafaína.

Produtos contendo racemato de cavaína sintético não podem ser vistos como análogos aos extratos do vegetal, já que a biodisponibilidade é altamente influenciada pelos demais componentes do extrato (SIMÕES, 2001).

O mecanismo de ação das cavalactonas ainda não é completamente esclarecido, existindo na literatura relatos contraditórios sobre a interação das cavalactonas com o receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA). Um trabalho indica aumento dos sítios de ligação (modulação de receptores), enquanto outro relata ausência de atividade significativa nos sítios de ligação GABA-A e GABA-B e no sítio de ligação de benzodiazepínicos. Tanto em estudos “*in vivo*” como “*in vitro*” apenas uma fraca atividade de ligação com GABA foi observada (DAVIES et al., 1992). Um outro estudo, entretanto, estabelece que a ligação com o GABA é um mecanismo para alguns efeitos sedativos da kava (KELEDJIAN et al., 1988). Estudos, “*in vitro*” tem demonstrado que embora não sendo compreendido o eficiente bloqueio da serotonina pelas cavalactonas, a inibição de noradrenalina foi demonstrada por três lactonas, indicando outros possíveis mecanismos de ação. Segundo Gleitz et al. (1996), em modelos experimentais com animais, a kava kava é conhecida por inibir a convulsão induzida experimentalmente. Pesquisas indicam que este efeito anticonvulsivante possa ser mediado por sítios receptores de canais de sódio (Na^+).

São descritos ensaios clínicos controlados, em humanos, com resultados positivos em ansiedade usando uma preparação contendo 70 ou 100mg de extrato enriquecido(70% de cavalactonas), administrado três vezes ao dia, pelo período de quatro semanas (SIMÕES, 2001). A dosagem indicada para humanos varia de 70 a 240 mg de extrato seco da raiz. Dosagem acima de 330mg/dia tem sido testada sem aumentar a frequência de efeitos adversos (ERNST, 2002b). Já no caso de pequenos animais, como os caninos e felinos, a dosagem recomendada varia de 5,5 a 11mg/kg (BASKO, 2002).

Por ter ação antidepressiva, antiestresse, ansiolítica, relaxante muscular e sedativa, a kava kava passou a ter uma demanda crescente. Atualmente, são encontrados no mercado brasileiro, um número expressivo de fitoterápicos preparados a partir de *P. methysticum*, entre eles: KAVA KAVA (FLORA MEDICINAL)[®], KAVA KAVA (TEUTO)[®], KAVA KAVA (HERBARIUM)[®], CALMITON[®], ANSIOPAX[®], KAVASEDON[®] (ANVISA, 2002). Em farmácias de

manipulação, são preparadas fórmulas magistrais, em geral cápsulas, utilizando-se como matéria-prima o extrato seco padronizado com 70% de cavalactonas (RATES et al., 2002).

Entre as atividades relatadas da kava kava, podemos citar: relaxante muscular, analgésica, sedativa (KELEDJIAN, et al., 1988; SEITZ et al., 1997; SCHIRMACHER et al., 1999), anticonvulsivante e anestésica (GRUNZE et al., 2001), espasmolítica, ansiolítica (MALSCH et al., 2001; SMITH et al., 2001) e neuroprotetor (SCHMIDT; FERGER, 2001). A maioria dos relatos é de sistemas “*in vitro*” ou estudos pré-clínicos em animais. As ações ansiolítica e sedativa são respaldadas por ensaios clínicos (MALSCH; KIESER, 2001).

A kava kava pode apresentar como efeitos adversos reações alérgicas, pigmentação da pele, fotossensibilização e prurido (LITTI, 2001). A ingestão da bebida em doses equivalentes a mais de 300g da raiz de *P. methysticum* por semana, durante alguns meses pode causar dermatopatia, caracterizada por edema de face, coloração amarelada dos cabelos e unhas, lesões escamosas nos membros torácicos e pélvicos. Estes sintomas desaparecem algumas semanas após a interrupção do tratamento. Os principais efeitos adversos são a fadiga matinal no início do tratamento, movimentos involuntários estereotipados, prejuízos na deglutição e respiração, contrações involuntárias, arrítmicas e contínuas das extremidades (ROBBERS et al., 2002). Segundo Stevinson et al. (2002), quando utilizada como monoterapia e nas doses recomendadas, a kava kava parece ser bem tolerada pela maioria dos usuários, todavia, efeitos adversos têm sido reportados necessitando de pesquisas adicionais para determinar a frequência e natureza destes eventos.

Os medicamentos preparados com *P. methysticum* têm eficácia ansiolítica sem apresentar os mesmos efeitos adversos dos benzodiazepínicos, como prejuízo das funções cognitivas, sonolência e redução da coordenação motora (TYLER & ROBBERS, 2000).

Este fitoterápico potencializa a ação de outros depressores do SNC, não devendo ser utilizado concomitante com essas substâncias depressoras, nem previamente a procedimentos que requeiram anestesia geral (RATES et al., 2002). Segundo Ernst (2002b), como a kava kava prolonga os efeitos da anestesia, deve ser interrompida duas ou três semanas antes destes procedimentos. Relatos indicam que a kava kava pode aumentar os efeitos adversos das drogas que afetem a dopamina, como o haloperidol e a metoclopramida.

Um outro aspecto que deve ser considerado é a interação com outras drogas como, por exemplo, as analgésicas. Incidências de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade podem ser aumentadas com o uso de acetaminofeno concomitante com plantas com potencial hepatotóxico como *Echinacea* e *P. methysticum*. Além disso, o uso de analgésicos opióides com suplementos de plantas sedativas como valeriana, kava kava e camomila podem levar a uma potencialização da depressão do SNC (ABEBE, 2002).

O *P. methysticum* administrado por via oral tem rápida absorção gastrointestinal, de modo que os efeitos são observados quase imediatamente. O pico plasmático ocorre aproximadamente 1,8 hora após a ingestão. A eliminação ocorre por excreção renal e pelas fezes. É biotransformado pelo sistema do citocromo P-450 no fígado, podendo ter interações com outras plantas ou drogas (MALANI, 2004).

Os distúrbios de ansiedade e hiperexcitabilidade, muito vistos em humanos, têm se tornado rotina na clínica veterinária de pequenos animais. Sendo assim, existe uma busca por tratamentos alternativos para tratar estes distúrbios. Os fitoterápicos, principalmente, a valeriana e a kava kava têm sido bastante utilizados, como tratamentos alternativos (SCHWARTZ, 2000).

Recentemente casos de hepatotoxicidade foram associados ao uso de fitoterápicos à base de *P. methysticum*. Stickel et al. (2003), analisaram 36 casos de hepatite relacionados com a ingestão de kava kava, ocorridos entre 1990 e 2002. Para tanto, utilizaram uma escala diagnóstica clínica estabelecida para reações adversas hepáticas da droga. Obtiveram como resultado, necrose hepática ou hepatite colestática, ambas associadas a extratos alcoólicos e acetônicos de kava kava. Nove pacientes desenvolveram falência hepática fulminante, dos quais, oito pacientes foram submetidos a um transplante de fígado. Três pacientes morreram, destes, dois pacientes após o transplante de fígado e um que não havia realizado o transplante. Todos os outros pacientes tiveram uma completa recuperação após a interrupção do uso da kava kava. Este estudo enfatiza o potencial hepatotóxico severo da kava kava, o qual tem levado, recentemente, a proibição de preparações contendo kava pelas autoridades da farmacovigilância da Alemanha, Suíça e França.

Segundo Ernst (2002b), não está esclarecido se os casos de hepatotoxicidade, associados ao uso da kava kava, estão relacionados a doses elevadas, uso a longo prazo, associação com

outras drogas ou, até mesmo, a existência de danos hepáticos pré-existentes. Em um estudo realizado para testar a função hepática em ratos tratados com extrato aquoso, foram administrados diariamente extratos de kava kava nas dosagens de 200 ou 500mg de cavactonas/kg por duas ou quatro semanas. Foram avaliadas as enzimas alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase para avaliar função hepática, mas os resultados não apresentaram elevação dos níveis destas enzimas, ocorrendo em alguns casos uma significativa redução, sugerindo a falta de efeitos tóxicos no fígado.

A kava kava deve ser evitada durante a gestação pois pode afetar a musculatura uterina. As substâncias químicas contidas nas preparações de kava kava, podem passar para o leite materno com efeitos desconhecidos e conseqüentemente deve ser evitada durante a gestação e amamentação (ERNST, 2002b).

2.2 Toxicidade reprodutiva

A toxicidade reprodutiva está relacionada com qualquer interferência na capacidade reprodutiva, tanto em machos como fêmeas, provocada por um agente que produza toxicidade. Uma avaliação toxicológica é utilizada para analisar resultados experimentais de uma substância química com o objetivo de classificá-la e ao mesmo tempo fornecer informações a respeito da forma correta de seu emprego. Os dados toxicológicos são informações obtidas através da experimentação de animais de laboratório, em ensaios com microorganismos ou através de registro de casos de intoxicação acidental ocorridos em humanos e animais (LARINI, 1997).

Segundo a legislação vigente os testes de teratogenicidade devem ser realizados em duas espécies animais uma roedora, sendo normalmente utilizada a espécie *Rattus norvegicus* (freqüentemente a linhagem Wistar) e uma espécie animal não roedora, como por exemplo o coelho. Os animais devem ser adultos jovens (BRASIL, 2004a).

Os ratos machos atingem uma maturidade sexual entre 60 e 75 dias de vida. Já as fêmeas encontram-se sexualmente maduras entre 90 e 100 dias de vida. O ciclo estral é regular de natureza poliéstrica anual, com ciclos estrais de 4 a 5 dias, ao longo do ano. (COBEA, 1996; CHAHOUD & KWASIGROCH, 1977).

Segundo Chahoud e Kwasigroch (1977) os ciclos estrais são divididos em 4 fases, normalmente avaliadas mediante exame de citologia vaginal:

- I) Proestro (12h): caracterizado por um grande número de células nucleadas e algumas células proliferativas do epitélio vaginal;
- II) Estro (14h): caracterizado pela presença de células queratinizadas anucleadas; a ovulação ocorre espontaneamente na metade do ciclo escuro durante esta fase;
- III) Metaestro (21h): inúmeros leucócitos e filamentos de muco;
- IV) Diestro (57h): período de repouso, em que a mucosa vaginal apresenta-se delgada, com poucas células nucleadas, poucos leucócitos e muco.

Os ratos, em vários laboratórios, são acasalados na proporção de três fêmeas para cada macho, durante todo o período de escuridão, exceto nos experimentos em que o momento da cópula deve ser determinado para avaliar a idade gestacional. Após a confirmação da prenhez, mediante a presença de espermatozóides na citologia vaginal, as fêmeas são colocadas em gaiolas individuais, e este é considerado o dia zero de prenhez.

O período de desenvolvimento embriológico e fetal consiste em mudanças e variações complexas, sendo dividido em quatro períodos:

- 1) Período de implantação: logo após a fecundação, é marcado pela fusão dos núcleos do óvulo e do espermatozóide; após o ovo atinge o estágio de blástula que se segue pelo implante do blastocisto no útero. Neste período, qualquer interferência produzida por um medicamento leva a embriofetalidade, sendo rara a ocorrência de teratogênese.

- 2) Período de organogênese: abrange a proliferação, diferenciação e migração celular até a organogênese propriamente dita, que consiste na formação dos órgãos rudimentares. Medicamentos administrados às mães nesta fase, podem levar a teratogênese, se a lesão for compatível com a vida do animal, ou a embriofetalidade, caso não seja.
- 3) Período de desenvolvimento fetal: todos os tecidos já estão formados e os animais crescem, sendo que alguns sistemas sofrem maturação nesta fase.
- 4) Período neonatal: histogênese, alteração funcional, ganho de peso corporal. A exposição a medicamentos neste período pode produzir redução do peso corporal, desordens funcionais e carcinogênese.

Os testes de toxicidade pré-natal, toxicidade do desenvolvimento ou de teratogenicidade avaliam a exposição de um mamífero a agentes químicos durante o período de gestação. Neste período, a cinética de uma substância química é modificada devido às novas condições fisiológicas maternas e às transformações na nova unidade experimental que se impõe à unidade materno/placentária/fetal. Estes testes de toxicidade pré-natal são delineados para avaliar os efeitos da exposição de animais durante o período de gestação e sobre o organismo em desenvolvimento. Isto inclui a observação dos efeitos maternos e dos efeitos na prole, tais como morte, alterações estruturais ou do desenvolvimento embriofetal. Uma das alterações que podem ocorrer neste teste são as alterações funcionais que embora de grande importância não podem ser avaliadas neste tipo de teste (LEMÔNICA, 2001).

Atualmente os termos malformação ou má-formação não significam apenas formação anormal ou defeituosa de tecidos, mas também anormalidades bioquímicas. Estas podem ser causadas pela ação direta de um agente tóxico, substância química, radiações, entre outras, sobre o produto da concepção ou secundariamente, através da ação sobre o organismo materno. As malformações induzidas por agentes patológicos, químicos ou ambientais durante o período de desenvolvimento dos órgãos de um animal, podendo ser de natureza estrutural (morfológicas) e/ou funcional (bioquímica), é chamado de teratogênese (BERNARDI, 1999). Alterações reprodutivas como as anomalias congênitas, podem ocorrer espontaneamente sendo causadas por fatores endógenos ou por influência de substâncias tóxicas causando efeitos teratogênicos (EPA, 1996a).

As plantas medicinais têm seu uso descrito por praticamente todos os povos desde os tempos mais remotos. Mas muitas plantas contêm substâncias capazes de exercer ação tóxica sobre organismos vivos. Segundo algumas teorias, essas substâncias seriam formadas com a função de defender a espécie de seus predadores. Por isso, não é surpresa que muitas plantas acumulem substâncias de elevada toxicidade, como os glicosídeos cianogênicos, presentes na mandioca-brava; proteínas tóxicas como a ricina, presente na mamona; muitos alcalóides como a coniina, presente na cicuta. Cabe ressaltar que muitas plantas são completamente desconhecidas quanto ao potencial de causar intoxicações (MENGUE et al., 2001).

Na utilização de qualquer medicamento durante a gestação, deve sempre ser considerada a relação risco-benefício. Plantas como a *Abrus precatorius* L. (jequiriti), a *Casearia silvestris* S. (chá-de-bugre), *Coleus barbatus* B. (boldo), *Ruta chalepensis* L. (arruda), *Symphytum officinale* L. (confrei), são apenas algumas, de muitas existentes, conhecidas por causarem aborto ou suspeita de qualquer outro risco para a gestação (MENGUE et al., 2001). Já o *Piper methysticum* Forst (kava kava), utilizado como ansiolítico, apresenta uma carência de estudos relacionados com a gestação.

Para que se pudesse avaliar o efeito amplo de um agente sobre todas as etapas da reprodução foram propostos três segmentos que compreendem a observação dos efeitos tóxicos de um xenobiótico durante os períodos de diferente sensibilidade intra-uterina, sobre o desempenho reprodutivo e sobre o desenvolvimento pós-natal dos animais expostos (LEMÔNICA, 2001). Segundo EPA (1996b), podemos dividir os estudos de toxicologia reprodutiva em :

- a) Segmento I - de toxicidade crônica, avalia os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas, sendo os machos tratados antes e durante o período de acasalamento e as fêmeas durante a prenhez e lactação;
- b) Segmento II - de teratogenicidade, que avalia as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese.
- c) Segmento III - de toxicidade peri e pós-natal, avalia os efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

2.3 Toxicidade hepática

A crescente utilização de plantas medicinais em todo o mundo, ocorre por ser um produto natural mas principalmente por uma idéia errônea de que os produtos naturais são isentos de qualquer efeito tóxico. Sabe-se que muitas plantas contém substâncias capazes de exercer ação tóxica no organismo (MENGUE et al., 2001).

Muitas plantas são tóxicas para o fígado. As plantas *Lantana camara* (Lantana), *Tetradynia glabrata* (Rabo de coelho), *Tribulus terrestris* (Videirinha), são alguns exemplos de plantas hepatotóxicas (PEARSON, 1993). O *Piper methysticum* é uma planta que não está na lista das plantas hepatotóxicas, mas recentemente vem sendo associada a casos de hepatotoxicidade (SINGH; DEVKOTA, 2003).

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo situado na cavidade abdominal que desempenha muitas e importantes funções como: metabólicas, excretoras e secretoras, de armazenamento, de proteção, de circulação e de coagulação sangüínea. Ele recebe irrigação através da veia porta (70%) e uma porção menor através da artéria hepática. Pela veia porta chega ao fígado todo o material absorvido nos intestinos, com exceção de parte dos lipídios. É um órgão que metaboliza e acumula nutrientes, neutraliza e elimina substâncias tóxicas absorvidas. Essa eliminação se dá através da bile que também auxilia na digestão de lipídios (MOTTA, 2003).

O fígado é composto estruturalmente de hepatócitos, um sistema de ductos biliares um rico suprimento sangüíneo, tanto venoso quanto arterial. Os parâmetros clinicopatológicos usados para avaliar o fígado refletem estes componentes estruturais e podem ser divididos em testes de enzimas séricas e testes funcionais (MEYER et al., 1995).

A doença hepática tem duas conseqüências fisiopatológicas principais: diminuição do número de hepatócitos íntegros e alteração da microcirculação hepática. Nas hepatopatias agudas há destruição de hepatócitos, sugerindo que a capacidade metabólica hepática diminui como resultado do menor número de hepatócitos funcionantes, e não pela diminuição da função de cada hepatócito. Nas hepatopatias crônicas, além da diminuição do número de hepatócitos, ocorre alteração da microcirculação hepática, dificultando as trocas entre hepatócitos e o sangue sinusoidal (BORGES, 2001).

Uma das principais funções do fígado é a desintoxicação. O que faz do fígado um local propício a sofrer uma agressão tóxica (MACLACHLAN; CULLEN, 1998). O processo necessita que toda a droga seja transportada para o fígado e depositada no hepatócito. Essa ação torna o fígado extremamente susceptível a danos tóxicos. Várias substâncias tóxicas como o tetracloreto de carbono, toxina de *Amanita phalloides*, drogas terapêuticas como o paracetamol em excesso, clorpromazina, eritromicina, halotano, causam danos diretos ao fígado e resultam em processos inflamatórios e necróticos similares ao da hepatite ou colestase (MOTTA, 2003).

O grau de lesão hepática, causado por substâncias químicas ou biológicas é variável, podendo ocorrer apenas alterações leves das enzimas hepáticas, não apresentando sintomas clínicos, até casos graves de insuficiência hepática aguda ou crônica (JOHNSON, 1997). Dentre as toxinas mais comuns podemos citar as químicas e metais pesados, além de certas plantas, especialmente aquelas associadas ao crescimento de fungos e produção de aflatoxina (HARDY, 1992).

Existem vários fatores que influenciam a toxicidade de uma substância, como a composição, a solubilidade, a polaridade, a ionização e a formulação e interações químicas diretas. Além desses fatores referentes à própria substância tóxica, existe o fator referente ao animal como sua capacidade de metabolização, doenças concomitantes, estado nutricional, idade, sexo, espécie, raça, linhagens e vias de exposição (SAKATE, 2002).

Segundo Pearson (1993), o fígado tem maior propensão a sofrer lesões por exposições crônicas, porque a exposição aguda a dosagens elevadas, freqüentemente, leva à morte antes que tenha ocorrido a destruição hepática. O grau de lesão hepática é mensurado através da avaliação das enzimas hepáticas, sinais clínicos inespecíficos como anorexia, vômito, perda de peso, poliúria e polidipsia (JOHNSON, 1997). Casos iniciais de moléstia hepática geralmente são detectados apenas pelo aumento dos níveis da atividade de enzima hepática no soro (PEARSON, 1993).

As enzimas séricas usadas rotineiramente no diagnóstico clínico de lesões hepáticas estão presentes em altas concentrações no fígado. Nas injúrias hepatocelular ou colestase do fígado, essas enzimas hepáticas são liberadas no plasma (KANEKO et al., 1997). As enzimas podem ser liberadas devido à necrose celular ou aumento da permeabilidade da membrana celular. Essa

última situação pode ser transitória e completamente reversível, com a liberação somente de enzima citoplasmática ou ligada à membrana celular. A atividade enzimática no plasma depende do número de células envolvidas por unidade de tempo, da concentração celular da enzima e de sua localização subcelular. Alta concentração nas células e uma meia vida longa no plasma transformam a enzima em um indicador sensível de dano hepático (DUNN, 2001). Dentre essas enzimas podemos citar alanina-aminotransferase (ALT); asparatato-aminotransferase (AST); gama-glutamil-transferase (GGT); fosfatase alcalina (FA); creatino-fosfoquinase (CK); sorbitol desidrogenase (SD) entre outras (MOTTA, 2003).

A ALT é uma enzima de grande importância nos animais domésticos pois é encontrada em grande quantidade nos hepatócitos do cão, gato, rato e coelho, sendo considerada específica para lesão hepática nestas espécies. Os níveis de sua elevação dependem do grau de duração da lesão. Dentre as principais patologias do fígado que encontramos níveis elevados desta enzima estão a hepatite infecciosa canina, hepatite tóxica, processos tóxico-químicos, tumores hepáticos, uso de fármacos (corticóides e hormônios) entre outros. As concentrações maiores desta enzima são evidenciadas nas lesões agudas (SILVEIRA, 1988). O tempo de meia-vida da ALT varia de 3 horas a 3 dias. O aumento da atividade desta enzima é diretamente proporcional ao número de hepatócitos lesados e não ao grau da lesão. (BUSH, 1991).

Segundo Loeb (1997), a mensuração da enzima alanina aminotransferase é hepatoespecífica para ratos e camundongos, enquanto para porquinhos da Índia é considerada uma enzima inespecífica para avaliar o sistema hepático. Em ratos a mensuração do sorbitol desidrogenase tem demonstrado ser mais hepatoespecífica e mais sensível, para detectar injúrias hepatocelulares, quando comparado com outras enzimas.

Uma outra enzima utilizada para auxílio diagnóstico de lesões hepáticas é a FA (fosfatase alcalina). Esta enzima está presente em vários tecidos, principalmente no tecido ósseo, sistema hepatobiliar e mucosa gastrintestinal. Esta enzima é o indicador mais sensível de colestase (fluxo biliar prejudicado), porque sua atividade aumenta antes de se detectar níveis elevados de bilirrubina (BUSH, 1991). A elevação da FA depende do grau de obstrução canalicular, atingindo valores 20 a 30 vezes maior que o normal em uma obstrução total em caninos e felinos

(STROMBECK & GUILFORD, 1991). O aumento da FA pode ocorrer nos casos de necrose e degeneração hepática (BUSH, 1991).

Segundo Borges (2001), o termo lesão hepática deve ser usado somente após estudo histológico do fígado; a lesão será então denominada de acordo com os achados histológicos. Esses achados incluem alterações, encontradas nos hepatócitos, como deposição de gordura, pigmentação, amiloidose e degenerações. A tumefação celular é uma das primeiras alterações microscópicas identificáveis após uma lesão de grau leve. Além disso, pode ocorrer a degeneração gordurosa, que é considerada a manifestação mais importante de doença hepática tóxica, fibrose e hiperplasia biliar (MACLACHLAN; CULLEN, 1998).

3 OBJETIVOS

Contribuir com os conhecimentos sobre a utilização de um fitoterápico, existente no mercado brasileiro, empregado como ansiolítico e sedativo, avaliando a toxicidade pré-natal com o uso de *Piper methysticum* Forst, Piperaceae (kava kava®) em ratas Wistar expostas no período de organogênese, avaliando as possíveis alterações no desenvolvimento das progênes.

Avaliar, também, possíveis alterações hepáticas em ratas Wistar tratadas com *Piper methysticum* Forst, Piperaceae (kava kava®), durante o período da gestação, através da mensuração das enzimas hepáticas ALT e FA e da histopatologia do fígado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Toxicidade reprodutiva do *Piper methysticum* Forst, Piperaceae (Kava kava®)

4.1.1 Animais

Foram utilizados 96 ratos Wistar (72 fêmeas e 24 machos) com idade de 90 dias, provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram adaptados durante 15 dias antes do início do experimento às condições do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS).

Os animais foram mantidos sob condições constantes de umidade, temperatura ($21^{\circ}\text{C}\pm 2$) e obedecendo a um ciclo de 12 horas de luz (das 9 às 21h) e 12 horas no escuro (das 21 às 9h). Eles receberam ração comercial (Nuvilab CR1-Nuvital) e água à vontade, durante todo o período do experimento.

As fêmeas foram mantidas em grupos de cinco em cada gaiola plástica, enquanto os machos foram colocados isolados em gaiolas até o momento do acasalamento.

4.1.2 Acasalamento

Para o acasalamento introduziu-se três fêmeas virgens na gaiola de cada macho durante três horas por dia (das 6h às 9h), correspondendo ao final do período escuro. Os animais foram acasalados até que se obtivesse um mínimo de 10 fêmeas prenhes para cada grupo.

O início da gestação foi confirmado através da citologia vaginal (estro) que evidenciava presença de espermatozoides e células queratinizadas no esfregaço vaginal, o qual foi realizado

diariamente e analisado ao microscópio óptico com aumento de dez vezes. Vinte e quatro horas após a constatação de espermatozoides no esfregaço vaginal, foi considerado como primeiro dia da gestação.

As fêmeas prenhas foram colocadas em gaiolas plásticas individuais, com maravalha limpa, recebendo 200g de ração e 500ml de água que eram pesados e renovados a cada 3 dias (para controle de ração e água até o dia da cesariana).

4.1.3 Preparação fitoterápica testada

Foi utilizada uma formulação fitoterápica contendo *Piper methisticum* Forst, Piperaceae, denominada kava kava®, lote 774201, produzido em outubro de 2001, pelo Herbarium Laboratório Botânico LTDA. (Av. Santos Dumont, 1111 – Colombo – PR), com validade até outubro de 2004. Registrado no Ministério da Saúde sob o número 11860023, este fitoterápico é comercializado em forma de pó de rizoma de kava kava, em cápsulas de 400mg.

4.1.4 Tratamento dos animais

Para a avaliação da toxicidade da kava kava foi utilizado o segmento II de avaliação de toxicidade pré-natal conforme normas da Agência de Proteção Ambiental (“*Environmental Protection Agency - EPA*”) (EPA, 1996b) e recomendações da Administração de Drogas e Alimentos (“*Food and Drug Administration*” - FDA) e da Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômica (“*Organization for Economic Cooperation and Development*” - OECD).

Conforme este segmento as fêmeas gestantes foram tratadas do 6º ao 15º dia de gestação, por via oral com auxílio de sonda oro-gástrica e sempre na parte da manhã.

Foram constituídos quatro grupos experimentais:

- O grupo controle que recebeu água destilada em volume idêntico aos dos grupos DH, DHx7 e DHx10.
- O grupo DH que recebeu 5mg.kg^{-1} , dose indicada para humanos (ERNST, 2002)
- O grupo DHx7 que recebeu 35mg.kg^{-1}
- O grupo DHx10 que recebeu 50mg.kg^{-1}

O fitoterápico foi diluído em água destilada, de forma que as diferentes concentrações pudessem ser administradas em volume de 5ml.kg^{-1} .

4.1.5 Variáveis avaliadas

4.1.5.1 Ratas

Todas as fêmeas foram avaliadas a partir do primeiro dia de gestação, quanto ao desenvolvimento ponderal (ganho de massa corporal), consumo a cada 3 dias de água e ração; mortalidade; sinais de toxicidade sistêmica como perda de peso progressiva e redução da ingestão de água e ração.

A massa corporal das ratas prenhes foi mensurada diariamente e relacionada à massa corporal do dia zero de prenhez, considerada 100%, utilizando-se a fórmula:

$$\text{Massa corporal relativa} = \frac{\text{massa corporal diária (g)}}{\text{massa corporal do dia zero (g)}} \times 100$$

Os consumos de água e ração foram medidos a cada três dias e relacionados à massa corporal média do mesmo período, conforme as fórmulas:

$$\text{Consumo relativo de água} = \frac{\text{consumo de água (ml)/3}}{\text{massa corporal média dos 3 dias (g)}} \times 100$$

$$\text{Consumo relativo de ração} = \frac{\text{consumo de ração (g)/3}}{\text{massa corporal média dos 3 dias (g)}} \times 100$$

4.1.5.2 Avaliação dos fetos e órgãos das ratas

No 21º dia de gestação, as ratas foram pesadas e anestesiadas com tiopental sódico na dose de 50mg.kg⁻¹, por via intraperitoneal. Foi realizada uma incisão abdominal mediana ventral para realização de coleta de sangue da veia cava caudal, retirada do útero gravídico, mensuração da massa uterina e da massa corporal da rata sem o útero. Logo após a abertura da cavidade abdominal, imediatamente antes da retirada dos órgãos, era efetuada a abertura do tórax para realização da eutanásia.

Nos ovários, foi contado o número de corpos lúteos e, no útero, o número de sítios de implantação. Órgãos, como o fígado, o baço, os rins, o coração e pulmões também foram inspecionados macroscopicamente, pesados e colocados em solução de formol tamponado a 10%. O fígado foi encaminhado para análise histopatológica na Universidade de Passo Fundo.

As massas dos órgãos foram relacionadas à massa corporal de cada rata sem útero, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Massa relativa do órgão} = \frac{\text{massa do órgão (g)}}{\text{massa corporal sem útero (g)}} \times 100$$

Para avaliação dos fetos foi realizada uma incisão longitudinal no útero, os fetos foram removidos e avaliados macroscopicamente quanto a malformações macroscópicas externas, vitalidade, sexo e peso de cada um. Após os fetos foram fixados, em solução de formol tamponado a 10%, por um período mínimo de sete dias para posterior diafanização, conforme a

técnica modificada de Taylor e VanDyke (1985), e posterior avaliação das anomalias esqueléticas.

4.1.5.3 Método de diafanização e coloração

Removidos do formol tamponado, os fetos foram imersos em álcool etílico 70°GL por 24h e posteriormente em álcool etílico 90°GL, por mais 24h, para promover a desidratação. Após as vísceras foram removidas por uma incisão na região abdominal e os fetos foram imersos em uma solução tampão de borato de sódio a 30% por 24h . Posterior a essas 24h utilizou-se uma nova solução de borato de sódio a 30% acrescida de 1g/litro de tripsina para promover a digestão de tecidos moles. Os fetos eram mantidos nesta solução à temperatura aproximada de 37 °C, até que ficassem transparentes pela completa dissolução da musculatura. Quando os fetos estavam transparentes eram colocados imersos em uma solução de hidróxido de potássio a 1,5%, com a adição do corante de alizarina por 24 à 48h. Por fim os fetos passaram por uma seqüência de imersões em soluções de glicerina a 40%, 70% com hidróxido de potássio a 1,5% por 48h cada uma e posteriormente mantidos em glicerina 100%.

Os fetos diafanizados foram observados quanto à presença de alterações no esqueleto por meio de microscópio estereoscópico com aumento de 0,7 a 4 vezes. As anormalidades esqueléticas foram avaliadas de acordo com o “Atlas de anormalidades esqueléticas e externas em ratos” (“*Atlas of external and skeletal anomalies in rats*”) (CHAHOUD, 1997) e denominadas conforme a terminologia da Federação Internacional da Sociedade de Teratologia (*International Federation of Teratology Societies*) (WISE et al., 1997).

4.1.6 Avaliação dos índices reprodutivos

Para avaliação dos índices reprodutivos levou-se em consideração o número de fetos por rata, as perdas pré-implantação e as perdas pós-implantação. As perdas pré e pós-implantação eram calculadas conforme as fórmulas a seguir (LEMÔNICA et al., 1996):

$$\text{Perdas pré-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}} \times 100$$

$$\text{Perdas pós-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação} - \text{n}^\circ \text{ de fetos}}{\text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação}} \times 100$$

4.1.7 Avaliação dos índices fetais

Para avaliação dos índices fetais como a taxa (Tx) de natalidade, proporção de sexo, malformações macroscópicas externas e anormalidades esqueléticas foram utilizadas as fórmulas a seguir (EPA, 1996b):

$$\text{Tx de natalidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

$$\text{Proporção de machos} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos machos}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

$$\text{Proporção de fêmeas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos fêmeas}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

$$\text{Tx de malformações externas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de fetos malformados}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

$$\text{Tx de anormalidades esqueléticas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de fetos com anormalidades esqueléticas}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

4.1.8 Dosagem de enzimas hepáticas e histopatologia do fígado

Após a anestesia das ratas e abertura da cavidade abdominal, coletou-se em torno de 3ml de sangue da veia cava caudal, para análise bioquímica. O sangue foi armazenado em frascos sem anticoagulante e encaminhado para o laboratório de análises clínicas da Universidade Luterana do Brasil. Para análise dos níveis séricos das enzimas ALT e FA foi utilizado o Kit comercial Labtest Diagnóstica e posteriormente efetuou-se a leitura em aparelho de espectrofotometria.

Após o sacrifício das ratas, o fígado foi removido e acondicionado em formol tamponado e encaminhado para avaliação histopatológica, a qual foi realizada no laboratório de histopatologia da Universidade de Passo Fundo.

4.1.9 Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando o teste de análise de variância de uma via (ANOVA). Foi utilizado o programa SPSS para Windows 8.0 e o EXCEL 2000. As variáveis quantitativas como o desenvolvimento ponderal das ratas e o consumo de água e ração foram avaliados através de análise de variância de uma via, bem como a massa relativa dos órgãos das ratas, o número de corpos lúteos, sítios de implantação e o número de fetos. Quando necessário efetuou-se o pós-teste de Kruskal-Wallis ou Scheffé para identificação dos grupos estatisticamente diferentes.

As variáveis qualitativas, como perdas pré e pós- implantação, proporção de sexo, taxas de viabilidade, taxas de malformações externas e alterações esqueléticas, foram avaliadas através do teste qui-quadrado. As diferenças foram consideradas significativas sempre que $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Toxicidade reprodutiva do *Piper methysticum* Forst, Piperaceae (kava kava®)

A toxicidade sistêmica foi inferida pela modificação do desenvolvimento ponderal, consumo de água e ração e outros sinais como atividade geral, vitalidade, resposta ao toque, tônus postural, força de agarrar, reflexo auricular e corneal, tremores, convulsões, hipnose, anestesia micção, piloereção, respiração ruidosa. A toxicidade reprodutiva foi inferida pela avaliação dos índices reprodutivos e alterações esqueléticas.

5.1.1 Desenvolvimento ponderal das ratas durante a prenhez

A Figura 4 mostra o ganho relativo de massa corporal (dia 1 = 100%), do 1° ao 21° dia de gestação, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) das ratas descritas no item 4.1.5.1.

O *P. methysticum* não alterou o desenvolvimento ponderal normal das ratas prenhes. Houve um aumento significativo de massa corporal relativa para todos os grupos, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A média e o erro padrão da média podem ser observados na Tabela 1.

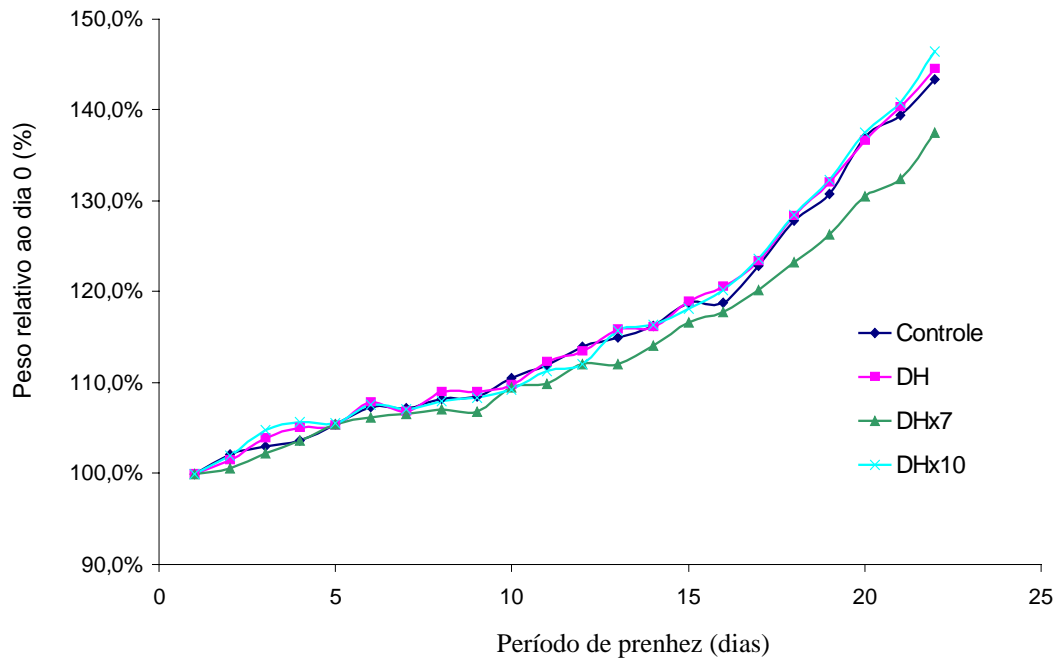


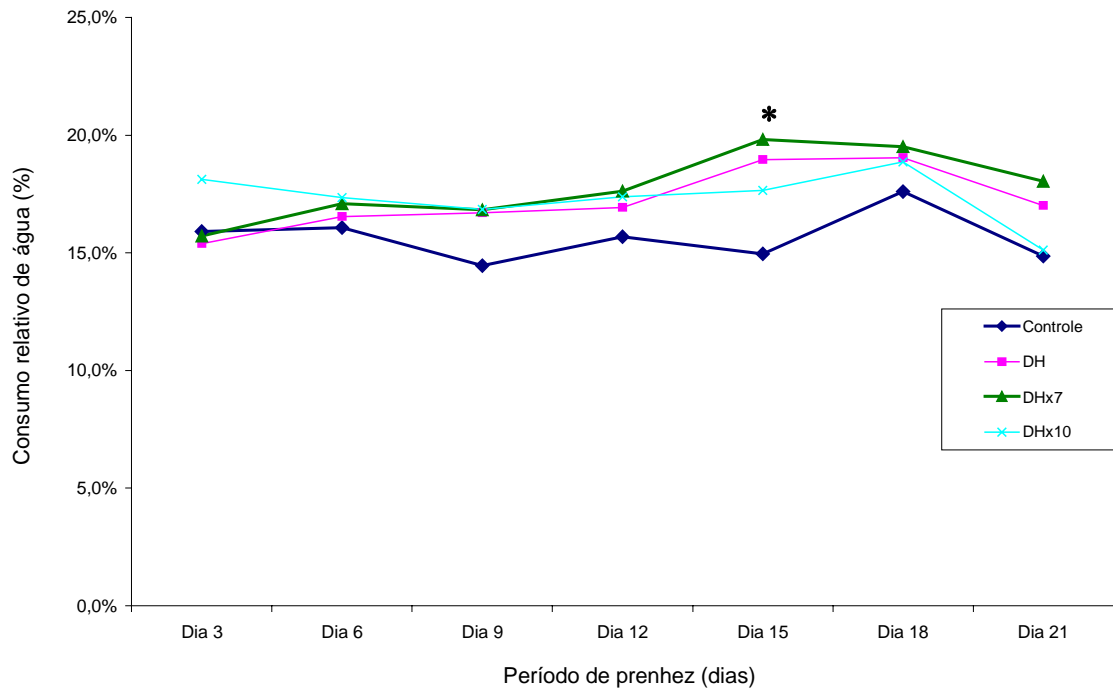
FIGURA 4. Desenvolvimento ponderal relativo (1º dia = 100%) das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}); e tratadas com *P. methysticum* DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6º e o 15º dia de gestação. Dados expressos pela média .

TABELA 1. Massa corporal média (\bar{x}) em gramas e erro padrão da média (epm) das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}); e tratadas com *P.methysticum* DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6º e o 15º dia de gestação.

Dias	Controle (n=11)		DH (n=10)		DHx7 (n=10)		DHx10 (n= 11)	
	\bar{x}	epm	\bar{x}	epm	\bar{x}	epm	\bar{x}	epm
Dia 01	222,50	7,87	237,15	7,88	229,20	7,46	216,59	6,90
Dia 02	227,10	8,03	240,52	8,08	230,42	7,28	220,85	6,59
Dia 03	229,25	8,38	246,30	8,55	234,20	9,12	227,00	6,63
Dia 04	230,70	8,75	249,00	9,25	237,55	8,14	228,77	6,16
Dia 05	234,68	8,08	249,60	9,23	241,50	8,52	228,73	6,10
Dia 06	238,68	8,79	255,70	9,00	243,50	8,27	233,00	7,13
Dia 07	238,64	8,52	253,30	8,50	244,30	9,30	231,77	6,68
Dia 08	240,73	9,14	258,45	8,99	245,55	8,66	233,86	7,20
Dia 09	240,41	8,64	258,30	9,09	244,90	8,93	234,55	7,46
Dia 10	245,82	9,58	260,40	9,50	250,85	9,24	236,59	7,80
Dia 11	248,86	9,29	266,35	8,92	251,85	10,05	241,00	7,63
Dia 12	253,64	8,82	269,10	9,68	256,90	9,72	242,64	7,26
Dia 13	255,91	8,96	274,85	9,57	256,85	9,51	250,55	8,53
Dia 14	258,77	9,27	275,25	10,22	261,60	9,76	252,09	7,96
Dia 15	264,18	9,73	282,00	9,58	267,35	9,35	255,86	8,43
Dia 16	264,18	8,95	285,85	10,62	269,90	9,98	260,32	8,35
Dia 17	273,41	9,05	292,60	10,73	275,60	10,27	267,64	8,54
Dia 18	284,50	9,33	304,30	11,24	282,35	10,58	278,36	9,10
Dia 19	291,00	9,27	313,20	11,63	289,40	11,45	286,50	9,22
Dia 20	304,82	10,28	324,00	12,75	299,10	12,83	297,77	9,35
Dia 21	310,18	10,03	332,65	13,60	303,50	13,73	304,95	9,99

5.1.2 Consumos relativos de água durante a prenhez

O *P. methysticum* não interferiu no consumo médio de água (Figura 5) em relação a massa corporal (%) durante a prenhez. Verificou-se que, tanto as ratas do grupo controle como as ratas tratadas com *Piper methysticum* apresentaram um consumo relativo de água semelhante durante toda prenhez. Entretanto, houve diferença significativa ($p = 0,026$) ao nível de 5%, entre o grupo controle e o grupo DHx7 (teste de Scheffé) no 15º dia de prenhez.



*Diferença significativa ao nível de 5% em relação ao grupo controle.
De acordo com o teste de Scheffé, o controle se diferencia significativamente do grupo DHx7.

FIGURA 5. Consumo relativo de água das ratas do grupo controle ($0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); e tratadas com *P. methysticum* DH ($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); DHx7 ($35\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e DHx10 ($50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) entre o 6º e o 15º dia de gestação. Dados expressos pela média.

A média e erro padrão da média dos grupos controle, DH, DHx7 e DHx10 podem ser observados na Tabela 2.

TABELA 2. Média (\bar{x}) e erro padrão da média (epm) do consumo de água (ml), medida a cada 3 dias nos grupos controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com *P. methysticum* DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação.

Dias	Controle (n=11)		DH (n=10)		DHx7 (n=10)		DHx10 (n=11)	
	\bar{x}	epm	\bar{x}	epm	\bar{x}	epm	\bar{x}	epm
Dia 03	107,50	6,48	112,50	11,38	111,00	12,69	120,45	6,69
Dia 06	114,00	11,45	125,50	8,08	123,00	8,24	119,55	6,27
Dia 09	104,55	7,12	129,50	8,99	124,50	8,51	118,18	8,80
Dia 12	117,27	5,70	135,50	9,87	135,00	10,65	125,45	10,67
Dia 15	116,36	8,06	157,50	12,89	155,00	8,47	134,55	9,71
Dia 18	144,55	8,10	168,00	8,10	162,00	10,39	153,18	11,62
Dia 21	135,91	10,33	170,00	26,42	161,00	9,39	135,45	10,28

5.1.3 Consumos relativos de ração durante a prenhez

O *P. methysticum* não interferiu no consumo médio de ração (Figura 6) em relação à massa corporal (%) durante a prenhez. Verificou-se que, tanto as ratas do grupo controle como as ratas tratadas com *P. methysticum* apresentaram um consumo relativo de ração semelhante durante toda prenhez. A média e erro padrão da média dos grupos controle, DH, DHx7 e DHx10 são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3. Média (\bar{x}) e erro padrão da média (epm) do consumo de ração (g), medida a cada 3 dias nos grupos controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com *P. methysticum* DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação.

Dias	Controle (n=11)		DH (n=10)		DHx7 (n=10)		DHx10 (n=11)	
	\bar{x}	epm	\bar{x}	epm	\bar{x}	epm	\bar{x}	epm
Dia 03	44,98	2,82	48,94	3,33	44,71	4,32	41,84	2,43
Dia 06	60,11	2,80	69,64	4,42	62,54	3,86	59,38	2,59
Dia 09	60,59	2,49	73,60	4,49	66,25	3,52	61,36	2,79
Dia 12	65,65	3,09	72,80	4,25	63,85	4,72	62,73	3,85
Dia 15	67,23	3,08	80,85	5,36	70,45	3,25	72,68	4,02
Dia 18	81,55	3,81	84,60	4,65	74,65	4,25	75,00	4,59
Dia 21	74,32	4,03	80,30	5,58	72,25	3,30	69,95	3,76

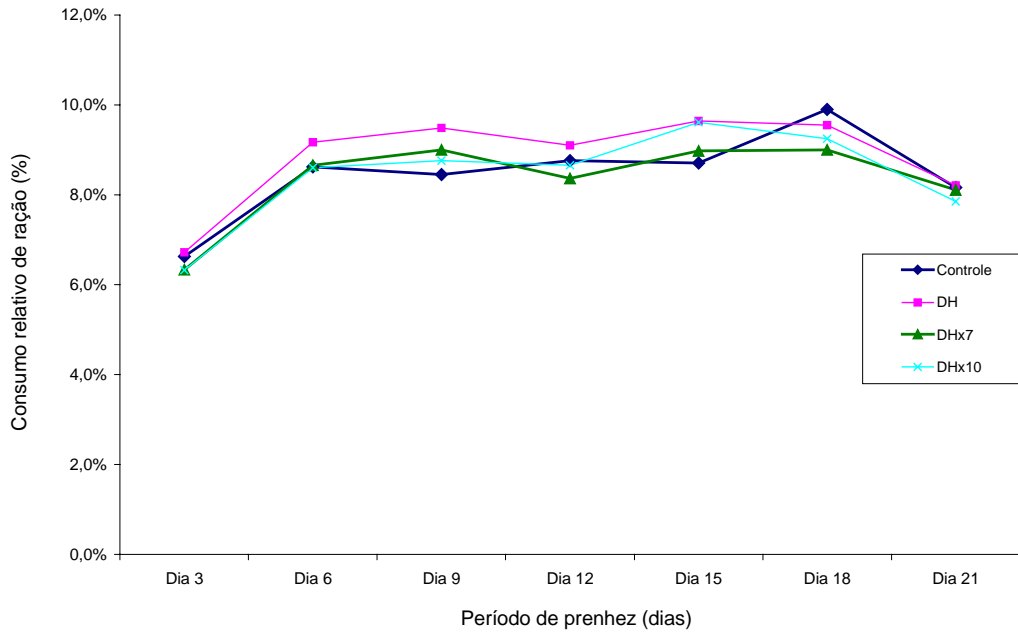


FIGURA 6. Consumo relativo de ração (g) das ratas do grupo controle ($0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); e tratadas com *P.methysticum* DH ($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); DHx7 ($35\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e DHx10 ($50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) entre o 6º e o 15º dia de gestação. Dados expressos pela média.

5.1.4 Índices reprodutivos

O *Piper methysticum* administrado, por via oral, do 6º ao 15º dia de prenhez, nas dosagens $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $35\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, não alterou significativamente o número de fetos por fêmeas, as perdas pré e pós- implantação das ratas (Tabela 4).

TABELA 4. Índices reprodutivos das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com *P. methysticum* DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação. Dados expressos pela média (\bar{x}) e desvio padrão (s).

Variáveis	Controle		DH		DHx7		DHx10		Valor de p
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	
N° filhotes	8,55	2,77	10,30	4,50	7,10	5,43	9,82	1,66	0,134 ^a
Corpos Lúteos	13,18	3,82	13,20	3,85	12,10	1,85	12,82	1,40	0,820
Sítios de implantação	9,45	2,94	11,10	4,07	9,00	4,67	10,45	1,97	0,530
Perda pré-implantação	26,8%	20,5%	19,5%	21,5%	26,9%	34,4%	18,1%	15,0%	0,660 ^a
Perdas pós-implantação	9,8%	9,1%	16,8%	31,5%	37,7%	39,9%	5,6%	5,6%	0,162 ^a

^a Devido à alta variabilidade demonstrada por elevados desvios-padrão, realizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A opção pela técnica não-paramétrica deve-se a rejeição da hipótese de homogeneidade de variância pelo teste de Levene.

5.1.5 Massa relativa dos órgãos

O *Piper methysticum* não alterou de forma significativa a massa relativa dos órgãos (%) das ratas, por via oral, do 6° ao 15° dia de prenhez, nas dosagens 5mg.kg^{-1} , 35mg.kg^{-1} , 50mg.kg^{-1} , em comparação ao grupo controle (Tabela 5).

5.1.6 Índices dos fetos

O *Piper methysticum* não alterou de forma significativa os índices dos fetos de ratas tratadas, em comparação ao grupo controle (Tabela 6). Para avaliação da vitalidade, alterações macroscópicas externas e relação de machos e fêmeas foi utilizado o qui-quadrado, enquanto o número de fetos e a massa corporal ao nascimento através da ANOVA. Ambos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

TABELA 5. Massa relativa dos órgãos (g) das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com *P. methysticum* DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação. Dados expressos pela média (\bar{x}) e desvio padrão (s).

		N	\bar{x}	S	Valor de p
Fígado	Controle	11	4,917	0,512	0,750
	DH	10	5,083	0,491	
	DHx7	10	4,884	0,579	
	DHx10	11	4,857	0,473	
Rim Direito	Controle	11	0,334	0,022	0,660
	DH	10	0,339	0,028	
	DHx7	10	0,329	0,024	
	DHx10	11	0,326	0,022	
Rim Esquerdo	Controle	11	0,327	0,025	0,829
	DH	10	0,327	0,020	
	DHx7	10	0,320	0,029	
	DHx10	11	0,318	0,035	
Adrenal Direita	Controle	11	0,014	0,002	0,541
	DH	10	0,015	0,006	
	DHx7	10	0,017	0,006	
	DHx10	11	0,016	0,004	
Adrenal Esquerda	Controle	11	0,016	0,003	0,671
	DH	10	0,018	0,005	
	DHx7	10	0,016	0,004	
	DHx10	11	0,018	0,004	
Coração	Controle	11	0,318	0,030	0,326
	DH	10	0,314	0,023	
	DHx7	10	0,309	0,019	
	DHx10	11	0,329	0,028	
Pulmões	Controle	11	0,524	0,050	0,263
	DH	10	0,545	0,080	
	DHx7	10	0,506	0,063	
	DHx10	11	0,566	0,087	
Baço	Controle	11	0,358	0,073	0,708
	DH	10	0,334	0,062	
	DHx7	10	0,356	0,035	
	DHx10	11	0,339	0,046	

Sem diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA)

TABELA 6. Índices dos fetos das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com *Piper methysticum* DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação

Variáveis	Grupo			
	Controle	DH	DHx7	DHx10
N° ratas	11	10	10	11
N° filhotes	94	103	71	108
Vitalidade	100,0%	100,0%	92,9%	100,0%
Massa corporal (g)	$4,96 \pm 0,08$	$4,97 \pm 0,10$	$4,83 \pm 0,13$	$5,00 \pm 0,18$
Alterações macroscópicas	0	0	0	0
Proporção (macho, fêmea)	54%, 46%	46%, 54%	43%, 57%	47%, 53%

Sem diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA)

5.1.7 Anormalidades esqueléticas dos fetos

As anormalidades dos fetos foram avaliadas quanto às variações esqueléticas (Tabela 7) e quanto às malformações esqueléticas (Tabela 8). O tratamento das ratas com *Piper methysticum* administrado, por via oral, do 6° ao 15° dia de prenhez, nas dosagens 5mg.kg^{-1} , 35mg.kg^{-1} não aumentou a prevalência de variações esqueléticas nos fetos em comparação com as observadas, no grupo controle. Entretanto, no grupo tratado com 50mg.kg^{-1} de *Piper methysticum* foi encontrado um aumento significativo ($p = 0,016$ e $p = 0,001$, teste qui-quadrado, respectivamente) de ossificação incompleta das esternebras em relação ao grupo controle e fontanela aumentada, em comparação com o grupo DH e DHx7 (Figura 7). Com relação às malformações foi observado um aumento significativo ($p = 0,020$, teste qui-quadrado) na presença de costelas onduladas do grupo DHx10 em relação aos grupos DH e DHx7 (Figura 8).

Em todos os grupos, tratados e controle, as principais anormalidades observadas foram: ossificação incompleta do crânio (Figura 9), ossificação incompleta das esternebras (Figura 10), não ossificação das falanges dos membros anteriores (MAS) e membros posteriores (MPs) e metatarsos.

TABELA 7. Prevalência das anormalidades esqueléticas (variações) dos fetos das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com *P. methysticum* DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6º e o 15º dia de gestação. Dados expressos em número e percentual de fetos acometidos.

Ossificação incompleta	<i>Grupo</i>				Qui-quadrado
	Controle	DH	DHx7	DHx10	
Crânio	3 3,2%	1 1,0%	6 8,5%	7 6,5%	0,075
Escápula	1 1,1%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0,390
Supra-occipital	2 2,1%	0 0,0%	0 0,0%	1 0,9%	0,318
Esternebras	0 0,0%	6 5,8%	2 2,8%	10 9,3%	0,016*
<i>Não ossificação</i>					
Falanges dos MAs	53 56,4%	57 55,3%	36 50,7%	49 45,4%	0,372
Falanges dos MPs	6 6,4%	9 8,7%	8 11,3%	10 9,3%	0,740
Fontanela aumentada	5 5,3%	0 0,0%	0 0,0%	14 13,0%	0,001**
Metatarso	34 36,2%	41 39,8%	24 33,8%	37 34,3%	0,817
Esternebras	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 0,9%	0,477
Metacarpo	4 4,3%	0 0,0%	2 2,8%	2 1,9%	0,214
Nº ratas (fetos)	11(94)	10(103)	10(71)	11(108)	

MAs= Membros anteriores e MPs= membros posteriores

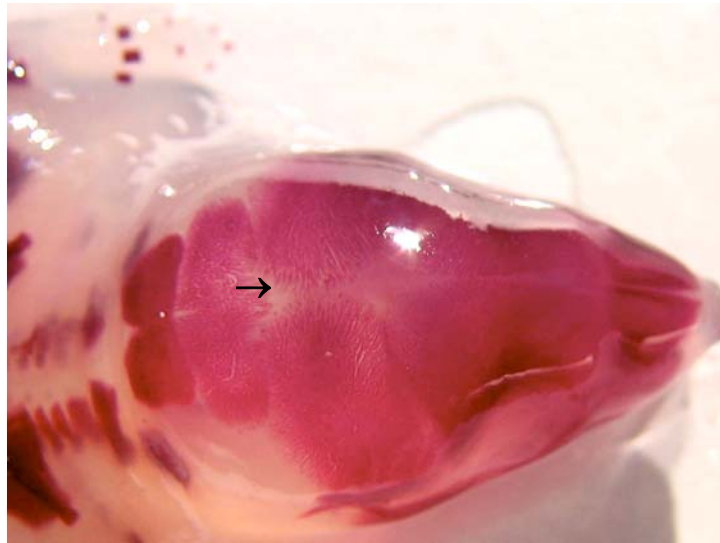
* Diferença significativa ao nível de 5%

** Diferença significativa ao nível de 1%

TABELA 8. Prevalência das anormalidades esqueléticas (malformações) dos fetos das ratas do grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com *Piper methysticum* DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6º e o 15º dia de gestação. Dados expressos em números e percentual de fetos acometidos.

Mal formações	Grupo				Qui-quadrado
	Controle	DH	DHx7	DHx10	
Costela supranumerária	8 8,5%	2 1,9%	7 9,9%	12 11,1%	0,068
Costelas onduladas	2 2,1%	0 0,0%	0 0,0%	6 5,6%*	0,020*
Esternebras ausentes	0 0,0%	1 1,0%	1 1,4%	1 0,9%	0,765
Esternebras bipartidas	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 0,9%	0,477
Esternebras fusionadas	1 1,1%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0,390
Esternebras disformes	2 2,1%	0 0,0%	2 2,8%	2 1,9%	0,465
Tuberosidade deltóide disforme	1 1,1%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0,390
Clavícula irregular	1 1,1%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0,390
Úmero disforme	1 1,1%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0,390
Radio/ulna curta	1 1,1%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0,390
Radio/ulna disforme	1 1,1%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0,390
Fêmur curto	1 1,1%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0,390
Metacarpo disforme	1 1,1%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0,390
Esternébra ossificação extra	0 0,0%	2 1,9%	0 0,0%	0 0,0%	0,149
Ossificação extra parietal	0 0,0%	0 0,0%	1 1,4%	0 0,0%	0,230
Atlas disforme	0 0,0%	0 0,0%	1 1,4%	0 0,0%	0,230
Nº ratas (fetos)	11 (94)	10 (103)	10 (71)	11(108)	

* Diferença significativa ao nível de 5%



A



B

FIGURA 7. Fetos diafazinados de progenitoras do grupo controle e tratados com *P.methysticum*. Figura A: feto do grupo controle demonstrando fontanela normal. Figura B: feto do grupo DHx10 demonstrando fontanela aumentada.

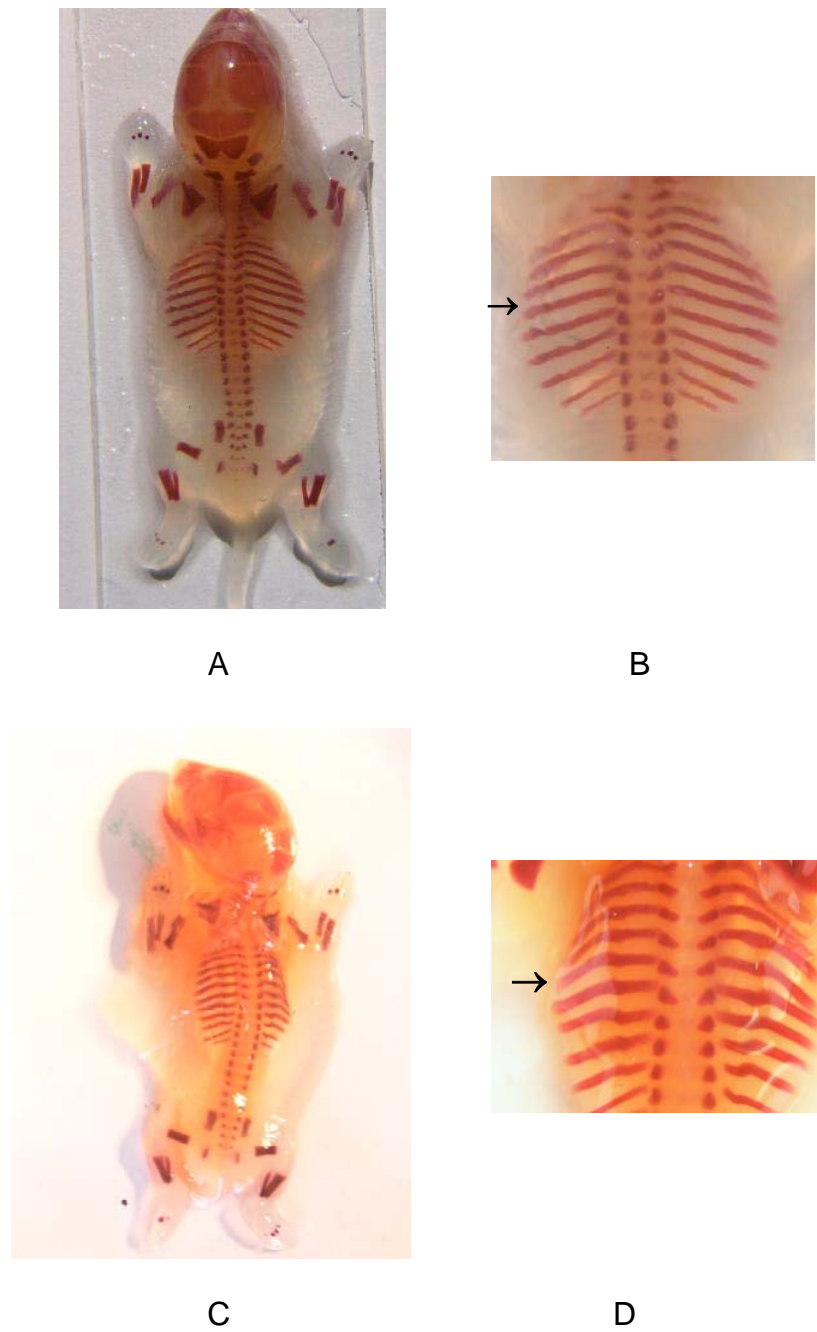


FIGURA 8. Fetos diafazinados de progenitoras do grupo controle e tratados com *P.methysticum*. Figura A: Feto do grupo controle apresentando costelas de formato normal. Figura B: Costelas normais em detalhe. Figura C: Feto do grupo DHx10 apresentando costelas onduladas. Figura D: Costelas onduladas em detalhe.



FIGURA 9. Feto diafanizado do grupo tratado com *P. methysticum* DHx10 apresentando ossificação incompleta do crânio.

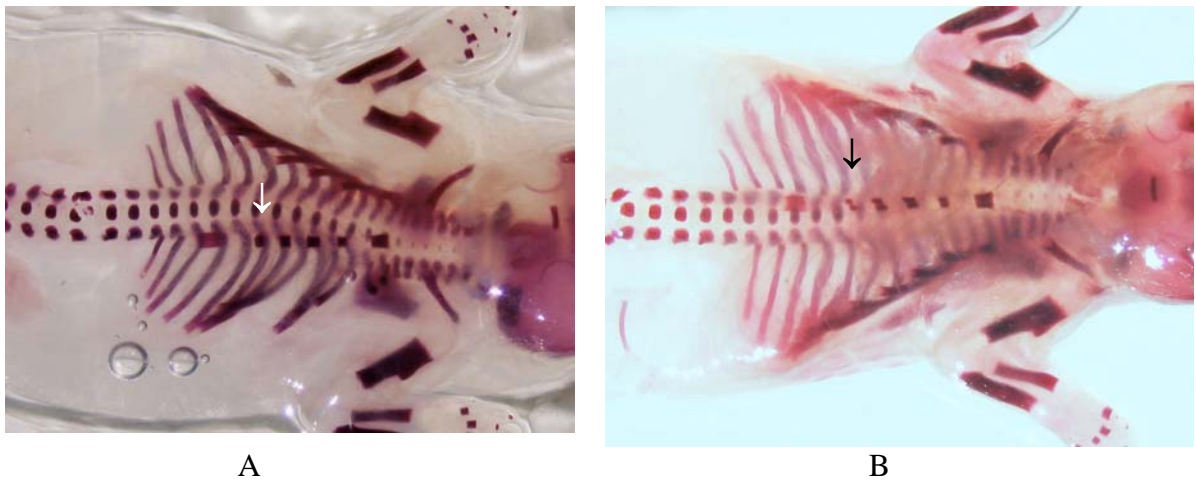


FIGURA 10. Fetos diafazinados de progenitoras do grupo controle e tratados com *P. methysticum*.
Figura A: Feto do grupo controle apresentando ossificação completa das esternebras. Figura B: Feto do grupo DHx10 apresentando ossificação incompleta das esternebras.

5.2 Toxicidade hepática

O *Piper methysticum* na dosagem de 0mg.kg^{-1} , 5mg.kg^{-1} , 35mg.kg^{-1} e 50mg.kg^{-1} , não provocou um aumento estatisticamente significativo na atividade da FA ($p = 0,62$) e ALT ($p = 0,51$) (Tabela 9).

TABELA 9. Níveis séricos da atividade da FA e ALT das ratas grupo controle (0mg.kg^{-1}) e tratadas com *P.methysticum* DH (5mg.kg^{-1}); DHx7 (35mg.kg^{-1}) e DHx10 (50mg.kg^{-1}) entre o 6° e o 15° dia de gestação. Dados expressos em média e desvio padrão.

	Grupo	N	\bar{x}	s	Valor de p
FA (U/l)	Controle	11	41,32	17,17	0,518 ^{ns}
	DH	10	42,10	11,80	
	DHx7	10	35,77	13,48	
	DHx10	11	45,97	18,02	
ALT (U/l)	Controle	11	30,31	13,29	0,625 ^{ns}
	DH	10	27,67	3,88	
	DHx7	10	26,10	3,67	
	DHx10	11	30,87	11,71	

^{ns} Diferença não-significativa entre os grupos ($P > 0,05$, ANOVA).

O *Piper methysticum* na dosagem de 0mg.kg^{-1} , 5mg.kg^{-1} , 35mg.kg^{-1} e 50mg.kg^{-1} , não provocou alterações histopatológicas no fígado. Apresentando apenas áreas com discreta tumefação celular e, em raros casos, uma leve dissociação dos hepatócitos. No fígado de dois animais, um do grupo DHx7 e outro DHx10, havia necrose coagulativa centrolobular multifocal, mas estas alterações não foram significativas estatisticamente e não obtiveram correlação com os valores enzimáticos.

6 DISCUSSÃO

As plantas medicinais têm seu uso descrito por praticamente todos os povos desde os tempos mais remotos. Entre o uso primitivo e mágico das plantas pelos curandeiros, até o conhecimento atual, existem diferenças difíceis de serem mensuradas. Entretanto, a partir do momento em que as plantas passam a ser utilizadas fora do seu contexto original, tornou-se necessário à avaliação de sua eficácia e segurança (MENGUE et al., 2001).

O surgimento do conceito de “natural”, em muito contribuiu para o aumento do uso das plantas medicinais nas últimas décadas. Para muitas pessoas esse conceito significa a “ausência de substâncias químicas”, que são aquelas que podem causar algum dano ou, de outra forma, representam perigo. Assim, “produtos naturais” passaram a ser sinônimo de produtos saudáveis, seguros e benéficos. Esse conceito é extremamente equivocado, já que muitas plantas contêm substâncias capazes de exercer ação tóxica sobre organismos vivos. Algumas plantas são fontes freqüentes de intoxicação, como a comigo-ninguém-pode, coroa-de-cristo. Algumas plantas apresentam um potencial abortivo como a *Ruta graveolens* L. (arruda), *Luffa operculata* L.(buchta), *Symphytum officinale* L. (confrei), outras apresentam pouca informação quanto à segurança para o uso durante a gestação como é o caso do *Peumus boldus* Mol. (boldo-do-chile), *Piper methysticum* (kava kava), entre outras (MENGUE et al., 2001).

O *P. methysticum* é um dos fitoterápicos mais utilizado no país para o alívio dos sintomas da ansiedade e insônia (ANVISA, 2002b). Mundialmente, a kava kava é utilizada para tratamento de ansiedade, insônia, alterações comportamentais, depressão, obesidade, entre outros, tanto em humanos como em animais. Na dosagem de 5mg.kg^{-1} dose indicada para humanos (ROBBERS, 2000), e menor dose indicada para pequenos animais; 35mg.kg^{-1} , sete vezes a dose indicada

para humanos e 50mg.kg^{-1} , que é dez vezes a dose indicada para humanos, o *P. methysticum* administrado por via oral do 6° ao 15° dia de gestação, não causou toxicidade sistêmica.

A toxicidade sistêmica é manifestada através de alterações no desenvolvimento ponderal dos animais, redução dos consumos de água e ração, alterações comportamentais como prostração, apatia e presença de pêlos arrepiados (MELLO et al., 1997). O fitoterápico testado neste trabalho não interferiu significativamente no desenvolvimento ponderal e no consumo de ração das ratas tratadas em relação ao grupo controle. Houve apenas um aumento significativo da massa corporal de todos os grupos, como já é esperado durante o período da gestação.

Em relação ao consumo de água observou-se que do 6° ao 15° dia de gestação os grupos tratados com *P. methysticum* apresentaram um consumo superior ao grupo controle, mas este não foi estatisticamente significativo durante todo o período avaliado. Apenas no 15° dia de gestação houve diferença significativa entre o grupo DHx7 (35mg.kg^{-1}) e o grupo controle. A possibilidade de ocorrer um aumento da ingestão de água por influência do *P. methysticum* não pode ser descartada.

A maior dosagem de *P. methysticum* (50mg.kg^{-1}) utilizado não apresentou efeitos adversos como dermatopatias (escamação, pele seca, icterícia), perda de pêlos, diminuição de apetite e redução de peso. Estes efeitos adversos, geralmente são observados quando são utilizadas altas doses de *P. methysticum* por períodos superiores a sessenta dias (ERNST, 2002a). Doses de 300 a 800mg por dia da cavalactona di-hidromethisticina, tem causado erupções cutâneas em pessoas (Piper..., 1998).

As ratas tratadas com *P. methysticum* não apresentaram diferenças significativas, nos índices fetais, em relação ao grupo controle, mas o grupo DHx7 (35mg.kg^{-1}) apresentou o menor número de filhotes e foi o único grupo que não apresentou 100% de vitalidade (92,9%). Uma das possibilidades para tentar explicar esta diminuição da vitalidade é porque uma das ratas deste grupo apresentou uma ninhada de 16 fetos e destes, cinco estavam mortos. Conforme Harkness e Wagner (1993), as ratas apresentam ninhadas que variam de 6 a 12 filhotes. Sendo assim, um número elevado de filhotes pode ter comprometido a vitalidade dos mesmos. Hapke et al. (1971)

não descartou a possibilidade de doses altas (200mg.kg^{-1}) de cavaina, dihidrocavaina e iangonina testados em coelhos causarem uma redução do número de fetos vivos por ninhada.

Em relação a massa corporal, tanto os filhotes do grupo controle como os dos grupos tratados com *P. methysticum* apresentaram peso ao nascer dentro dos parâmetros fisiológicos e sem diferença significativa entre os grupos. Conforme Hapke et al. (1971), a administração de uma mistura de princípios ativos isolados de cavaína (40%), dihidrocavaina (40%) e iangonina (20%) em suspensão a 5% em óleo vegetal, administrados por via oral em ratos Wistar, nas dosagens de 100 ou 500mg.kg^{-1} , do 6º ao 15º dia de gestação, determinou uma diminuição na média do peso fetal dos animais tratados em relação ao grupo controle, entretanto esta diminuição permanecia dentro dos limites fisiológicos. As diferenças entre os resultados podem ter sido causadas pelas diferentes dosagens empregadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho não revelaram aumento da prevalência de variações esqueléticas nos fetos das ratas tratadas com *P. methysticum* em comparação com o grupo controle. Porém houve um aumento significativo de ossificação incompleta das esternebras e fontanela aumentada do grupo DHx10 em relação aos grupos DH e DHx7. Hapke et al. (1971), não observou nenhum tipo de anormalidade esquelética ou visceral nos grupos testados com uma mistura de princípios ativos isolados de cavaína, dihidrocavaina e iangonina em doses de até 500mg.kg^{-1} em ratos Wistar e 200mg.kg^{-1} em coelhos. Segundo este autor, doses equivalentes a dose terapêutica humana, não provocaram efeitos teratogênicos ou embriotóxicos em ratos Wistar.

Conforme Lork (1977) as alterações esqueléticas podem ser variações do normal, retardos do desenvolvimento do esqueleto e malformações. As variações individuais consistem na ausência dos centros de ossificação esperados no momento da cesariana. Os retardos do desenvolvimento ósseo estão relacionados com a ausência dos centros de ossificação em estruturas bilaterais ou na presença de forma e/ou tamanho claramente sugestivos de um estágio precoce de desenvolvimento. Incluem-se nesta classificação as ossificações incompletas dos ossos do crânio e fontanelas aumentadas. Já as malformações do esqueleto estão relacionadas

com a ausência parcial ou total de ossos importantes, encurtamentos, arqueamentos, assimetrias, fusões, fendas ou duplicidade.

Möller (2003), em ensaios de toxicidade sistêmica e reprodutiva do antiparasitário à base de ivermectina, encontrou uma menor prevalência de fontanelas aumentadas na progênie das ratas tratadas com ivermectina (18%) em relação ao grupo controle (44%) e atribuiu este achado ao fato de poder haver uma pequena diferença na duração da prenhez (horas), que possam ser significativas para a calcificação terminal das fontanelas. No presente trabalho houve um aumento significativo de fontanelas aumentadas no grupo DHx10 (50mg.kg⁻¹) em relação ao grupo controle, porém não houve uma relação de dose-dependência, pois os grupos DH e DHx7 não apresentaram estes retardos de desenvolvimento ósseo. Não há uma explicação satisfatória relacionada com a presença de fontanela aumentada, pois a possibilidade de diferenças no período da gestação fica reduzido, visto que o acasalamento foi realizado nas três horas finais do período escuro.

Houve um grande percentual de não ossificação das falanges tanto nos membros anteriores como posteriores. Segundo Lork (1977) as falanges terminais dos ratos normalmente estão ausentes na hora da cesariana, devido à ausência dos centros de ossificação.

A prevalência de malformações esqueléticas nos fetos foi muito baixa neste trabalho e não apresentou uma relação de dose-dependência. A identificação de costelas onduladas no grupo DHx10 foi à única malformação esquelética estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Dallegrave (2003) em um ensaio de toxicidade reprodutiva do herbicida Glifosato-Roundup®, encontrou um aumento da ocorrência de várias alterações esqueléticas como ossificação incompleta dos ossos do crânio, fontanelas aumentadas apresentando uma relação de dose-dependência. As malformações incluíram bipartição dos ossos interparietais, supraoccipital e esternebras, ausência de vértebras caudais, costelas onduladas e não ossificação dos metatarsos e das falanges dos membros posteriores. Este conjunto de resultados demonstrou um aumento significativo no risco potencial ao sistema esquelético de ratos expostos a este herbicida durante a fase de organogênese fetal.

O *P. methysticum* Forst, não provocou alterações das enzimas hepáticas ALT e FA nem apresentou alterações histopatológicas relevantes nos fígados das ratas tratadas. Além disso, não houve alterações no desenvolvimento geral das fêmeas tratadas nem alteração do peso relativo de seus órgãos. Estes dados deixam evidente que o *P. methysticum* não provocou agressão hepática nas doses utilizadas. Mello (2001) em um trabalho com *Lantana camara*, uma planta hepatotóxica observou lesões hepáticas na histologia do fígado sem haver alterações no desenvolvimento geral dos animais.

Em casos de intoxicação por agentes hepatotóxicos, comumente, há o encontro de intensa vacuolização dos hepatócitos, hiperplasia dos ductos biliares, necrose multifocal coagulativa centrolobular e infiltração periportal de células inflamatórias, podendo ser encontrado apenas uma ou várias alterações dependendo da dose do agente. O exame histopatológico do fígado das ratas que foram tratadas com *P. methysticum*, na dosagem de 0mg.kg^{-1} , 5mg.kg^{-1} , 35mg.kg^{-1} e 50mg.kg^{-1} , apresentou apenas áreas com discreta tumefação celular e, em raros casos, uma leve dissociação dos hepatócitos. No fígado de duas ratas, uma do grupo DHx7 e outra DHx10, havia necrose coagulativa centrolobular multifocal, mas estas alterações não foram significativas e não obtiveram correlação com os valores enzimáticos.

Um estudo, utilizando dosagens de 200 e 500mg de infusão aquosa cavalactonas/kg/dia, por duas ou quatro semanas com o objetivo de avaliar o nível de toxicidade induzido pela kava kava na função hepática em ratos jovens por mensuração de enzimas hepáticas (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase) e formação de malondialdeído, um subproduto da peroxidação lipídica que pode induzir a dano hepático. Um aumento significativo destas enzimas ou do malondialdeído é considerado um indicador de toxicidade hepática. Como resultado, nenhuma destas enzimas apresentou elevação, apresentando inclusive uma significativa redução, no grupo testado por duas semanas apresentaram significativa redução, sugerindo falta de efeitos tóxicos da kava kava no fígado (SING; DEVKOTA, 2003). Entretanto Stickel et al. (2003) analisaram 29 casos de danos hepáticos associados ao consumo de extratos alcóolico e acetônico de kava kava, e concluíram que estes extratos apresentam um potencial hepatotóxico. Os pacientes apresentaram necrose hepática ou hepatite colestática, sendo que, nove pacientes necessitaram de transplante de fígado.

Clough et al. (2003) em um estudo realizado em uma comunidade indígena na Austrália, avaliaram a função hepática de pessoas acima de quinze anos, que utilizavam doses médias de 118g/semana de extrato aquoso de kava kava. Como resultado eles obtiveram um aumento significativo das enzimas GGT e FA dos grupos que haviam tomado o extrato aquoso nas últimas 24 horas e do grupo que havia tomado o extrato há mais de uma ou duas semanas. Não foi observado aumento da ALT em nenhum dos grupos. Este resultado confirma que o extrato aquoso de kava kava pode causar elevação das enzimas GGT e FA, mas estas alterações parecem ser reversíveis. A maioria dos usuários da kava kava tiveram um retorno dos níveis normais da FA um a dois meses de abstinência.

No presente estudo as amostras de sangue, para a realização dos testes das enzimas hepáticas, foram coletadas no dia do sacrifício das ratas (21º dia), ou seja, seis dias após o último tratamento com o *P. methysticum* Forst. Este fato pode ter colaborado para os valores das enzimas testadas estarem dentro dos parâmetros da normalidade. Além disso, uma outra hipótese para ausência de lesão hepática, e alterações das enzimas hepáticas pode ser atribuído ao fitoterápico ter sido testado por um curto período (dez dias), já que, na literatura os casos de hepatotoxicidade associados a kava kava foram associados a doses elevadas e um período de mais de três meses de uso e a soluções aquosas.

O fato da preparação fitoterápica *P. methysticum* Forst (Kava kava®), utilizada neste experimento não ter causado teratogênese em ratas Wistar tratadas com doses equivalentes a sete vezes a dose terapêutica humana ($35\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), não descarta a necessidade de maiores estudos, utilizando outras doses, talvez, extratos padronizados e outras espécies animais para aumentar a segurança deste produto em relação a teratogênese. Deve-se levar em consideração, também, que fatores como tipo de solo, região onde é plantada, época da colheita e armazenamento, podem interferir nas concentrações dos princípios ativos e conseqüentemente, na toxicidade das plantas.

7 CONCLUSÕES

A preparação fitoterápica contendo *P. methysticum* Forst, Piperaceae (kava kava®), administrada por via oral, do 6º ao 15º dia de gestação, nas dosagens de 5mg.kg⁻¹ o que equivale à dosagem utilizada para humanos, 35mg.kg⁻¹ e 50mg.kg⁻¹ em ratas Wistar, não interfere no desenvolvimento ponderal, consumo relativo de água e ração. As variáveis reprodutivas não são afetadas com as doses testadas. Entretanto as alterações morfológicas observadas com as dosagens mais elevadas (50mg.kg⁻¹), devem ser consideradas. Sendo assim, a preparação fitoterápica kava kava® pode ser considerada segura quando administrada, na dose até 35mg.kg⁻¹, durante o período da organogênese em ratas.

Na avaliação hepática da preparação fitoterápica *P. methysticum* Forst, Piperaceae (kava kava®), nas dosagens de 5mg.kg⁻¹, 35mg.kg⁻¹ e 50mg.kg⁻¹ em ratas Wistar, por via oral, do 6º ao 15º dia de gestação, não foram observadas alterações nas concentrações das enzimas ALT e FA. Assim como, não foram encontradas alterações significativas no histopatológico do fígado das referidas ratas, evidenciando não haver toxicidade hepática no período e doses utilizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. **Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics**. v.27 Issue 6 , p.391, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 05 jun. 2002a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilância/alerta/federal/2002/federal>>. Acesso em 22 out. 2002b.

BASKO, I. Piper methysticum (kava). **Journal of the American Holistic Veterinary Medical Association**. January, v.20.n.4, p. 17-24, 2002.

BASKO, I. Herb of the month: Piper methysticum. Disponível em: <<http://www.vbma.org/herbs/kavakava5-02.html>>. Acesso em 12 fev. 2004.

BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.566-574.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução – RE nº 356 de 28 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**; Brasília, D.F., 04 mar. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução – RE nº89 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Lista de registros simplificado de fitoterápicos”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**; Brasília, D.F., 18 mar. 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução – RDC nº48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**; Brasília, D.F., 18 de março 2004b. Seção1.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução – RE nº90 de 16 de março de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**; Brasília, D.F., 16 de mar. 2004c.

BRUNETON, J. Pharmacognosie, Phytochimie, **Plantes Medicinales**. 2.ed. Londres: Lavoisier, 1993. p. 263-264.

BUSH, B.M.; **Interpretation of laboratory results for small animal clinicians**. London: Blackwell Scientific Publications, 1991, p.311-340.

CHAHOU, I; KWASIGROCH, E. Controlled breeding of laboratory animals. In: NEUBERT, D.; MERKER, J; JWASUGRICGM T.E. **Methods in prenatal toxicology**. Berlin: Georg Thieme, 1977.p.78-91.

CHAHOU, I. **Atlas of external and skeletal anomalies in rats**. CD-ROOM, Berlin: PR & C Multimídia, Leipzig, 1997.

CLOUGH, A.R.; BAILIE, R.S.; CURRIE, B. Liver function test abnormalities in users of aqueous kava extracts. **Journal of Toxicology**, v.41, n.6, p.821-29, 2003

COBEA- COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2.ed. São Paulo: H.A. Rothschild, 1996. 259p.

DALLEGRAVE, E. **Toxicidade Reprodutiva do Herbicida Glifosato-Rundup® em Ratos Wistar**. 2003. 225p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DANTAS, P.R.M.; SASSI, A.P.; OLIVEIRA, D.A.J.; MAURÍCIO, T.H.T.; GOMES, I.S.B. **Malformações congênitas como causas de utilização de plantas medicinais durante a gestação**. Disponível em: <<http://www.portaldeginecologia.com.br/modules.php?name=news&file=article&sid=194>>. Acesso em 30 maio 2004.

DAVIES, L.P.; DREW, C.A.; DUFFIELD, P.; JPHNSTO, A.R.; JAMIESON, D.D. Kava pyrones and resin: studies on GABA-A, GABA-B, and benzodiazepine binding sites in rodent brain. **Pharmacology & toxicology**, v.71, n.2, p.120-126, 1992.

DUNN, J.K.; **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2001. p.458-459.

EPA – ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for reproductive toxicity risk assessment** – EPA/630/R-96/009, Washington, Sept. 1996a.

EPA – ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Health effects test guidelines reproduction and fertility effects** – OPPTS 870: 3800, Washington, 1996b.

ERNST, E. The risk-benefit profile of commonly used herbal therapies: ginkgo, st.John's Wort, ginseng, echinacea, Saw Palmetto, and kava. **Annals of Internal Medicine**. v.136.n.1.p.42-53, 2002a.

ERNST, E. Safety concerns about kava. **Lancet**. v.359, n.9320, p.1865, 2002b

FDA. Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em 05 jun. 2002.

GLEITZ, J., FRIESE, J., BEILE, A., AMERI, A., PETERS, T. Anticonvulsive action of (+/-)-kavain estimated from its properties on stimulated synaptosomes and Na⁺ channel receptor sites. **European Journal of Pharmacology**. v. 315, n.1, p.89-97, Nov. 1996.

GRUNZE, H.; LANGOSCH, J.; SCHURRNACHERM K.; BINGMANN, D.; VON WEGERER, J.; WALDEN, J. Kava pyrones exert effects on neuronal transmission and transmembraneous cation currents similar to established mood stabilizers – *areview* **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, n. 25, v.8, p.1555-1570, 2001.

HAMID, S.; ROJTER, S.; VIERLING, J. Protracted Cholestasis Hepatitis after use of Prostata®. **Annals of Internal Medicine**, v.127, n.2, p.169-170, 1997.

HAPKE, H.J.; STERNER, W.; HEISLER, E.; BRÄUER, H. Toxicological Studies With Kavaform. **Farmacologia ed. prat.** v.26, fasc11, p. 692-720, 1971.

HARDY, R.M. Moléstias do fígado e seus tratamentos. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1992.v.3, p.1547 – 1597.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores**. 3.ed. São Paulo: Roca, 1993. 238p.

HAYES, P.E.; KIRKWOOD, C.K. Anxiety Disorders. In: DIPIRO, J.T. et al., (Ed) **Pharmacotherapy: a Pathophysiologic Approach**. 2.ed. New York: Elsevier Science Publishing, 1992. p. 1092 – 1106.

Herbal medicines. **The Lancet Neurology**, v.2. February, 2003. Disponível em: <<http://neurology.thelancet.com>> Acesso em: 10 de mar. 2004.

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

KAVA. **European Bulletin of Drug Research**, v.9,n.1,p.233-238, 2001. Suplemento.

KAVA. **Lancet**, v.2, n.8605. p.258-259. 1988.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. P.309-349.

KELEDJIAN, J.; DUFFIELD, P.H.; HANUESIBM, D.D.; LIDGARD, R.O.; DUFFIELD, M. Uptake into mouse brain of four compounds present in the Psychoactive Beverage Kava. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.77, n.12, p.1003-1006, 1988.

LAPA, A.J; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C.M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2002, p.183-198.

LARINI, L. Avaliação toxicológica. **Toxicologia**. São Paulo: Manole, 1997.p.43-58.

LEMÔNICA, I.P.; DANASCEBI, D.C.; DI-STASI, L.C. Study of the embryotoxic effects of an extract of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, n.2, p.223-227, 1996.

LEMÔNICA, I.P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SANSEVERINO, M.T.V.; SPRITZER, D.T.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2001. p.19-39.

LECHTENBERG, M.; QYABDTM B.; KOHLEBBERG, F.; NAHARSTEDT. Qualitative and quantitative micellar electrokinetic chromatography of lavalactones from dry extracts of *Piper methiasticum* Forst and commercial drugs. **Journal of Chromatography A**. p. 457-456, 1999.

LITT, J.Z. **Drug Eruption Reference Manual**. British Library Cataloguing. USA. 2001. 450p.

LOEB, W.F. Clinical Biochemistry of Laboratory Rodents and Rabbits. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.845-855.

LORK, D. Evaluation of skeleton. In: NEUBERT, D.; NERKER, H.J.; KAWASIGROCH, T.E. **Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimntal animals**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1977.474p.

MACLACHLAN, N.J.; CULLEN, J.M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: CARLTON, W.W.; MACGAVIN, M. D. **Thomson: Patologia veterinária especial**. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. p.95-124.

- MALANI, J. Evaluation of the effects of Kava on the liver. Disponível em: <<http://www.spc.org.nc/cis/documents/Kava%20article%20Dr.Malani.pdf>>. Acesso em 20 maio 2004.
- MALSCH, U.; KIESER, M. Efficacy of kava-kava in the treatment of non-psychotic anxiety following pretreatment with benzodiazepines. **Psychopharmacology**. v.157, p. 277-283, 2001.
- MARQUES, L.C.; PETROVICK, P.R. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: SIMÕES, C.M.O; SCGEBKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2002.p.261-299.
- MELLO, F.B. Estudo dos Efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a Fertilidade e Reprodução de ratos. 2001. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MELLO, J.R.B.; LANGELOH, A.; HABERMEHL, G.; KREBS, H.C.; et al. Avaliação do extrato aquoso dos frutos de *Crotalaria retusa* Leguminosae sobre a fertilidade de ratas. **Arq. Fac. Vet. UFRGS.**, Porto Alegre: Faculdade de Veterinária da UFRGS, v. 25, n.2, p. 34-42, 1997.
- MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. In: SANSEVERINO, M.T.V.; SPRITZEL, D.T.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2001.p.423-450.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J.; **Medicina de Laboratório Veterinária: Interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. P.47-61.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações**. 4.ed. Porto Alegre: Ed. Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, EDUCS- Caxias do Sul, 2003.p.241-260.
- MÖLLER, V.M. **Estudo da Toxicidade Sistêmica e Reprodutiva dos Antiparasitários à Base de Ivermectina e de Lufenurona em Ratas Wistar**. 2003.96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- NORTON, S.A.; RUZE, P. Kava dermopathy. **Journal of the American Academy of Dermatology**. P. 89-97, 1994.
- PEARSON, E.G. Moléstias do sistema hepatobiliar. In: SMITH, B.S. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1993. p.839- 872

Piper methysticum (kava kava). **Alternativa Medicine Review**, v.3, n.6, p.458-460, 1998. Disponível em: <<http://www.thorne.com/altemedrev/fulltext/3/6/458.pdf>>. Acesso em 5 mar. 2004.

RATES, S.M.K.; EUFKER-LIMA, V.L.; AMARAL, P.A. **Revista Afargs**, nº10, 4p, 2002.
RHIZOMA PIPERIS METHYSTICI. WHO monographs on selected medicinal plants. p.231-245. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/library/trm/medicinal/plants/vol2/231to245.pdf>>. Acesso em 10 mar. 2004.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams e Wilkins. p. 101, 1996.

ROBBERS, J.E. Nervous System Disorders. In: ROBBERS, J.E. **Tyler's Herbs of choice: the therapeutic use of phytochemicals**. Estados Unidos, p.154-160, 2000.

SAKATE, M. Terapêutica das intoxicações. In: ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed.São Paulo:Roca, 2002.p.524-529.

SCHIRMACHER, K.; BUSSELBERG, D.; LANGOSCH, J.M.; WALDEN, J.; WINTER, U.; BRINGMANN, D. Effects of (+/-) – kavain on voltage-activated inward currents of dorsal root ganglion cells from neonatal rats. **Eur Neuropsychopharmacol**. p. 171-176, 1999.

SCHMIDT, N.; FERGER, B. Neuroprotective effects of (+/-)- kavain in the MPTP mouse of parkinson's disease. **Synapse**. v.40, n.1, p. 47-54, 2001.

SCHWARTZ, S. Recent advances in companion animal behavior problems. Massachusetts, USA: International veterinary information service, 2000. Disponível em:<<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 17 fev. 2004.

SEITZ, U.; AMERI, A.; PELZER, H.; GLEITZ, J.; PETERS, T. Relaxation of evoked contractile activity of isolated guinea-pig ileum by (+/-)-kavain. **Planta Medica**. v.63, n.4, p.303-306, 1997.

SHARAPIN, N. Normatização da Indústria Farmacêutica. IN: **Seminário sobre Industrialización y Legalización de Productos Fitofarmacéuticos en Iberoamérica e Reunión Constructiva de la Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos**, Guatemala, p.42-44, 1996.

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

SIMÕES, C.M.O. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 3.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 321.

SINGH, Y.N. Kava: an overview. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 37, p. 13-45, 1992.

SING, Y.N.; DEVKOTA, A.K.; Aqueous kava extracts do not affect liver function tests in rat. **Planta Med**, jun. 2003, v.69, 6 ed., p. 496-9.

SMITH, K.K.; DHARNARATNE, H.R.W.; FELTENSTEIN, M.W.; BROOM, S.L.; ROACHE, J.T.; NANAYAKKARA, N.P.D.; KHAN, I.A.; SUFKA, K.J. Anxiolytic effects of kava extract and kavalactones in the chick social separation-stress paradigm. **Psychopharmacology**, v. 155, p. 86-90, 2001.

STEVINSON, C.; HUNTLEY, A.; ERNST, E. A systematic review of the safety of kava extract in the treatment of anxiety. **Drug Safety**.v.25, n.4, p.251-61, 2002.

STICKEL, F.; BAULLER H.M.; SEITZ, K. *et al.* **Journal Hepatology**. v.39, p. 62-67, jul.2003

STROMBECK, D.R.; GUILFORD, W.G. **Small animal gastroenterology**. 2.ed. London:Wolfe Publishing, 1991.p.519-538.

TAYLOR, W.R.; VANDIKE, G.C.; Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium** v.9, p.107-119, 1985.

TYLER, V.E. & ROBBERS, J.E. **Tyler's herbs of choice**. The therapeutic use of phytomedicines. p.157-9, 2000.

WISE, L.D.; BECK, S.L.; BELTRAME, D. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1). **Teratology**, v.55, p.249-292, 1997.

WONG, H.B. Effects of herbs and drugs during pregnancy and lactation. **Journal Singapore Paediatrics Society**. v.21, p.169-78, 1979.