

**EMERSON LUIZ BOTELHO LOURENÇO**

**Toxicologia reprodutiva do extrato hidroalcoólico liofilizado da**

*Tropaeolum majus* L. **(chaguinha)**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino-Andrade

**CURITIBA**

**2012**




Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

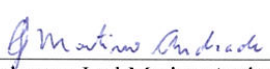



## PARECER

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado “TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DO EXTRATO BRUTO LIOFILIZADO DA *Tropaeolum majus* L. (CHAGUINHA)”, de autoria do pós-graduando **EMERSON LUIZ BOTELHO LOURENÇO**, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter e banca composta pelos professores: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter (Presidente - Farmacologia - UFPR), Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Schwarz (Análises Clínicas e Toxicológicas – UFRN), Prof. Dr. Anderson Joel Matino Andrade (Fisiologia – UFPR), Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior (Farmacologia – UNIPAR) e Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Ciências Farmacêuticas - UEPG) reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi APROVADO. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 14 de setembro de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter (Presidente - Farmacologia - UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Aline Schwarz (Análises Clínicas e Toxicológicas – UFRN)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Anderson Joel Matino Andrade (Fisiologia – UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior (Farmacologia – UNIPAR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Ciências Farmacêuticas - UEPG)



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



1                   **ATA DO JULGAMENTO DA 14ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

2           Ao décimo quarto dia do mês de setembro do ano de dois mil e doze, às nove horas, no  
3 Anfiteatro nº10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná,  
4 reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação  
5 em Farmacologia, de autoria do pós-graduando **EMERSON LUIZ BOTELHO**  
6 **LOURENÇO** intitulada: "TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DO EXTRATO BRUTO  
7 LIOFILIZADO DA *Tropaeolum majus* L. (CHAGUINHA)", sob orientação do Prof. Dr.  
8 Paulo Roberto Dalsenter e banca composta pelos professores: Prof. Dr. Paulo Roberto  
9 Dalsenter (Presidente - Farmacologia - UFPR), Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Schwarz (Análises  
10 Clínicas e Toxicológicas – UFRN), Prof. Dr. Anderson Joel Matino Andrade (Fisiologia –  
11 UFPR), Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior (Farmacologia – UNIPAR) e Prof. Dr.  
12 Michel Fleith Otuki (Ciências Farmacêuticas - UEPG). A Banca Examinadora iniciou os  
13 trabalhos. O candidato teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho,  
14 sendo em seguida arguido durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e  
15 tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão  
16 Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADO. De acordo com o  
17 Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi  
18 aprovado. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão  
19 conferidas por seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada  
20 a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo Presidente e pelos  
21 demais membros da banca examinadora, em Curitiba, 14 de setembro de 2012.

Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof.ª Dr.ª Aline Schwarz (Análises Clínicas e Toxicológicas – UFRN)

Prof. Dr. Anderson Joel Matino Andrade (Fisiologia – UFPR)

Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior (Farmacologia – UNIPAR)

Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Ciências Farmacêuticas - UEPG)

À minha esposa, **Elaine** que me deu suporte, apoio, amor e soube me compreender em todos os momentos!

Aos meus filhos, **Bruno** e **Luiz Felipe** por terem me proporcionado toda a felicidade e alegria e por terem por mim um amor incondicional.

Aos meus Pais, **Rubens** e **Marineide** por todo o amor, carinho, estrutura e confiança durante todos os momentos da minha vida.

A minha irmã **Daniele**, meu cunhado **Juliano**, e minha sobrinha **Natalia** pelo apoio nos momentos necessários.

A toda a família de minha esposa, principalmente **Luiz** e **Leopoldina** pelo apoio em todo período de minha ausência.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela minha vida, fé e saúde, que me fortaleceram durante toda esta caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter, pela confiança, ensinamentos, orientações e principalmente pela amizade e sinceridade em todo o nosso período de convivência.

Ao meu coorientador Anderson Joel Martino-Andrade pela atenção, ajuda e valorosa contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia pela atenção e cordialidade.

Aos companheiros de trabalho, pós-graduação e amigos Arquimedes e Irinéia, pelo substancial apoio e incentivo, principalmente nas longas viagens entre Curitiba e Umuarama.

Aos meus colegas de laboratório, Inês, Samanta, Leone e Fabíola, pela troca de experiências, aprendizado no laboratório, pela ajuda, pelo apoio nos momentos de dificuldade e pela amizade que construímos neste período.

As minhas especiais companheiras, Ana Cláudia, Juliane, Ana Carolina e Caroline pela substancial participação em todo o desenvolvimento deste trabalho e nos momentos de maior dificuldade.

Aos companheiros de pós-graduação, Stefani, Priscila, Sandra, Rita, Daniel, Artur, Bruno, André, Luisa, Rene e Fernanda pela amizade.

Aos parceiros do futebol Louzada, Randi, Gabriel e Herbert pela amizade e respeito durante nossas atividades esportivas.

Aos funcionários do biotério, do departamento de farmacologia e do setor de ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Às alunas de iniciação científica Bruna Minatovicz, Marina Vechi, Mariana Kienast e Natália Lombardi que me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

As secretárias da Pós Graduação do Departamento de Farmacologia pela atenção prestada.

Aos colegas de trabalho da Universidade Paranaense pelo apoio, principalmente em meus momentos de ausência.

Aos alunos do Laboratório de Toxicologia e Farmacologia Cardiovascular, Marcos Boffo, Thiago Leme, Thiago Prando, Tatiane, Lorena, Zezé, Douglas, Pamela, Nayara, Débora, Carol, Aline e Mariana pelo apoio constante.

As agências CAPES, CNPq e a Universidade Paranaense (UNIPAR) pelo apoio financeiro.

## EPÍGRAFE

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais  
voltará ao seu tamanho original”.*

*Albert Einstein*

|          |   |      |
|----------|---|------|
|          | <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>  | xi   |
|          | <b>LISTA DE SIGLAS .....</b>  | xii  |
|          | <b>LISTA DE SÍMBOLOS ABREVIATURAS.....</b>  | xiii |
|          | <b>RESUMO .....</b>   | xv   |
|          | <b>ABSTRACT .....</b>   | xvii |
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | 19   |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>  | 22   |
| 2.1      | USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....  | 22   |
| 2.2      | PLANTAS MEDICINAIS NA GRAVIDEZ.....   | 25   |
| 2.3      | LEGISLAÇÃO.....   | 29   |
| 2.4      | <i>Tropaeolum majus</i> L.....  | 33   |
| 2.4.1    | Distribuição.....   | 33   |
| 2.4.2    | Composição química .....  | 34   |
| 2.4.3    | Estudos em farmacologia e toxicologia com <i>Tropaeolum majus</i>                           | 34   |
| 2.5      | RISCO DO USO DOS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA<br>DE ANGIOTENSINA DURANTE A GESTAÇÃO..... | 36   |
| <b>3</b> | <b>HIPÓTESES .....</b>  | 39   |
| <b>4</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>  | 40   |
| 4.1      | OBJETIVO GERAL.....   | 40   |
| 4.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 40   |
| <b>5</b> | <b>MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS.....</b>   | 41   |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 5.1 | Artigo 1- Screening for <i>in vivo</i> (anti) estrogenic and (anti) androgenic activities of <i>Tropaeolum majus L.</i> and its effect on uterine contractility. Publicado no Journal of Ethnopharmacology, em 13 de março de 2012..... | 42  |
| 5.2 | Artigo 2- Toxicity of <i>Tropaeolum majus L.</i> in critical periods of pregnancy in Wistar rats. Submetido ao Journal of Ethnopharmacology, em 15 de agosto de 2012.....   | 62  |
| 6   | <b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....  | 85  |
| 7   | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 90  |
| 8   | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 91  |
|     | <b>ANEXOS</b> .....   | 107 |

## **APRESENTAÇÃO**

Esta tese está apresentada na forma de dois artigos descritos nos itens 5.1 e 5.2. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências encontram-se em cada artigo e representam a íntegra deste trabalho.

Na tese, o item 6, discussão, apresenta comentários gerais a respeito dos resultados obtidos nos dois artigos. No item 7, Conclusões, são apresentadas as conclusões gerais da tese. As Referências, item 8, refere-se às citações que aparecem na introdução e na discussão da tese.

**LISTA DE FIGURAS**

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Figura 1</b> | <i>Tropaeolum majus</i> L. (Foto do Horto de Plantas medicinais da Universidade Paranaense -Unipar)..... | 33 |
| <b>Figura 2</b> | Esquema dos efeitos de Angiotensina II no desenvolvimento tubular.....                                   | 38 |

**LISTA DE SIGLAS**

|         |   |
|---------|---|
| EMEA    | <i>European Medicines Agency</i> : Agência Europeia de Medicina.  |
| FDA     | <i>Food and Drug Administration</i> : Agência Federal de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos da América.            |
| ANVISA  | <i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i> .   |
| OECD    | <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> : Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico. |
| WHO     | <i>World Health Organization</i> : Organização Mundial de Saúde.  |
| RDC     | Resolução da Diretoria Colegiada.   |
| GTI     | Grupo de Trabalho Interministerial.   |
| SUS     | Sistema Único de Saúde.   |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura.   |

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

|                  |   |
|------------------|---|
| %                | - Por cento   |
| n <sup>o</sup>   | - Número  |
| TT               | - Tempo de trombina                                 |
| MCF-7            | - Células de câncer de mama hormônio dependentes    |
| μM               | - Micromolar  |
| PGE <sub>2</sub> | - Prostaglandina do tipo 2                          |
| mg               | - Miligramas  |
| kg               | - Kilogramas  |
| ECA              | - Enzima conversora de angiotensina                 |
| SRA              | - Sistema renina angiotensina                       |
| AT <sub>1</sub>  | - Receptor para angiotensina do tipo 1              |
| AT <sub>2</sub>  | - Receptor para angiotensina do tipo 2              |
| Ang I            | - Angiotensina 1                                    |
| Ang II           | - Angiotensina 2                                    |
| APA              | - Aminopeptidase                                    |
| ECA2             | - Enzima conversora de angiotensina do tipo 2       |
| EHTM             | - Extrato hidroetanólico de <i>Tropaeolum majus</i> |
| hCG              | - Gonadotrofina coriônica humana                    |
| eCG              | - Gonadotrofina coriônica equina                    |
| Ang III          | - Angiotensina 3                                    |

|         |                              |
|---------|------------------------------|
| Ang 1-7 | - Angiotensina 1-7           |
| NEP     | - Endopeptidase neutra       |
| PEP     | - Prolil endopeptidase       |
| Era     | - Receptor alfa do estrógeno |

## RESUMO

*Tropaeolum majus* L.(Tropaeolaceae) é uma planta medicinal popularmente utilizada no Brasil para o tratamento de processos inflamatórios e doenças cardiovasculares. Apesar de alguns dados da literatura demonstrarem sua eficácia com atividade diurética, hipotensora e anti-hipertensiva dependente da participação das prostaglandinas e inibição da enzima conversora de angiotensina (iECA) respectivamente, existem ainda poucos estudos em toxicologia descrevendo a segurança desta planta. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a atividade (anti) androgênica e (anti) estrogênica dos extratos hidroetanólicos liofilizados obtidos das folhas de *Tropaeolum majus* (HETM), bem como a possibilidade de seus efeitos sobre a contratilidade uterina e durante períodos críticos da gestação. Para estes estudos, três doses do extrato hidroetanólico de HETM (3, 30 e 300 mg/kg) ou veículo (água destilada 5 mL/kg) foram utilizados. Nos testes *in vivo* (Hershberger e uterotrófico) realizados para detecção de atividades em órgãos hormônio/dependentes não foram verificadas alterações significativas. Da mesma forma, também não foram observadas interferências na contratilidade uterina induzida por ocitocina ou ácido araquidônico. Para melhor avaliação do risco toxicológico, ratas Wistar prenhas foram tratadas diariamente por via oral em dois períodos críticos: pré-implantação (do 1º ao 7º dia de prenhez), ou período de pós-implantação (do 8º ao 20º dia de prenhez). Ao final de cada período de gestação, as ratas foram eutanasiadas e avaliados os seguintes parâmetros reprodutivos: Período pré-implantação: número de corpos lúteos e implantes, peso absoluto e relativo do útero, ovários, rins e supra-renais e níveis séricos de estradiol e progesterona. Período pós-implantação: pesos absoluto e relativo do fígado e útero, tamanho da ninhada, pesos fetais, número de fetos viáveis, número de reabsorções e parâmetros histológicos dos rins de fetos. Os resultados obtidos nestes estudos demonstraram no período pré-implantação significativas perdas de pré-implantes e aumento dos níveis de estradiol em todos os tratamentos quando comparados com o grupo controle. No período pós-implantação foi observada uma redução significativa no peso fetal (g) em machos e fêmeas e alterações morfológicas nas análises histológicas dos rins dos fetos (túbulos dilatados e cistos em tufo glomerulares em todas as doses utilizadas). Desta forma, concluímos que os extratos de *Tropaeolum majus* não interferiram na contratilidade uterina ao término da gestação, assim como não demonstraram atividade (anti) estrogênica ou (anti) androgênica. Entretanto, a exposição acarreta riscos ao feto durante todo o período gestacional verificada em períodos distintos através da redução do número de implantes e aumento dos níveis plasmáticos de estradiol nas progenitoras (período pré-implantação), e restrição do crescimento fetal e alterações morfológicas nos rins dos fetos (período pós-implantação), em todas as doses utilizadas. Os dados aqui apresentados suportam a hipótese de que a *Tropaeolum majus* apresenta grande potencial farmacológico, entretanto necessita de profunda avaliação de segurança no caso de sua indicação terapêutica incidir sobre o período gestacional.

**Palavras-chave:** *Tropaeolum majus* L.; toxicologia reprodutiva; plantas medicinais; gestação; teratogenia.

## ABSTRACT

*Tropaeolum majus* L.(Tropeaeolaceae) is a medicinal plant popularly used in Brazil for the treatment of inflammatory processes and cardiovascular diseases. Even though some literature data demonstrate its efficacy in diuretic, hypotensive and anti-hypertensive activity depending on prostaglandin participation and inhibition of angiotensin converting enzyme (iACE) respectively, there are still few studies in toxicology describing the safety of this plant. In this way, the objective of the present work was to evaluate the (anti) androgenic and (anti) estrogenic activity of the lyophilized hydroethanolic extract obtained from *Tropaeolum majus* leaves (HETM), as well as its possible effects on uterine contractility and during critical periods of gestation. For these studies, three doses of the hydroethanolic extract of *T. majus* (3, 30 and 300 mg/kg) or vehicle (distilled water 5mL/kg) were used. In the *in vivo* assays (Hershberger and uterotrophic) performed for the detection of activities in hormone dependent organs no significant alterations were observed. Still, no interferences were observed in uterine contractility induced by oxytocin or arachidonic acid. For a better evaluation of toxicological risk, pregnant Wistar rats were treated daily by oral route in two critical periods: pre-implantation (from 1<sup>st</sup> to 7<sup>th</sup> gestational day), or post-implantation (from 8<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> gestational day). At the end of each gestational period, the female rats were killed and the following reproductive parameters were evaluated: Pre-implantation period: number of implant and corpora lutea, absolute and relative weight of the uterus, ovaries, kidneys and adrenal glands, and serum levels of estradiol and progesterone. Post-implantation period: absolute and relative weights of liver and uterus, offspring size, fetal weight, number of viable fetuses, number of resorptions and histological parameters of fetuses kidneys. The results obtained in these studies demonstrated that in the pre-implantation period there were significant pre-implantation losses and increase in estradiol levels in all treatments when compared to control group. In the post-implantation period it was observed a significant reduction in fetal weight (g) in males and females and morphologic alterations in histological analyses of fetuses' kidneys (dilated tubules and cysts in glomerular tufts in all doses used). In this way, we conclude that extracts of *Tropaeolum majus* did not interfere with uterine contractility at the end of gestation, and showed no activity (anti) estrogenic or (anti) androgenic. However, the exposure brings risks to the fetus during the whole gestational period seen in different periods through the reduction of implant number and increase in plasma level of estradiol in the dams (pre-implantation period), and fetal growth restriction and morphologic alterations of the kidneys (post-implantation period), in all doses used. The data here presented support the hypothesis that *Tropaeolum majus* presents great pharmacological potential, however deep safety evaluation is needed for its therapeutic indication during pregnancy.

**Key words:** *Tropaeolum majus* L.; reproductive toxicology; medicinal plants; pregnancy; teratogenicity.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas mundialmente para o tratamento de várias doenças e através delas novas drogas estão sendo pesquisadas e desenvolvidas. Existem mais de 20.000 espécies sendo utilizadas na medicina tradicional e estas são potenciais reservatórios da descoberta de novas drogas (Gupta et al., 2008).

Historicamente, na medicina popular, diferentes grupos étnicos têm utilizado terapias alternativas para tratamento de doenças ou como suplemento alimentar. O uso popular de plantas medicinais por parte destes povos é creditado aos supostos baixos níveis tóxicos por serem de origem natural (Ling et al., 2008). Entretanto, plantas medicinais podem causar efeitos adversos ou podem interagir com outros medicamentos (Gadano et al., 2006). É importante ressaltar que o uso terapêutico de plantas pode estar relacionado a um amplo espectro de efeitos tóxicos, incluindo distúrbios metabólicos, alterações do sistema imune e endócrino, hepatotoxicidade e distúrbios comportamentais (Buttar e Jones, 2003; Jurgens, 2003).

Várias plantas com atividade medicinal têm sido utilizadas para o tratamento de diversas doenças como câncer, diabetes mellitus, asma, distúrbios intestinais, irregularidades no fluxo menstrual, arteriosclerose e artrite reumatóide (Kim et al., 2007). O interesse pela descoberta de novas moléculas com potencial farmacológico tem motivado as pesquisas com extratos de plantas em modelos animais. Dentro deste contexto, os produtos naturais apresentam-se como potenciais candidatos, pois 80% da população mundial utilizam plantas medicinais para o tratamento de suas enfermidades (Chechinell Filho e Yunes, 1998; Sartori et al., 2003; Santos et al., 2011).

No Brasil, 20% da população consomem 63% dos medicamentos disponíveis, enquanto o restante busca tratamentos alternativos (Reis e Mariot, 2001; Rodrigues et al., 2011). Contudo, o uso popular ou tradicional é insuficiente para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Os produtos naturais têm sido reconhecidos como importantes fontes de novos medicamentos terapêuticamente efetivos, sendo

que, de 520 novas drogas aprovadas entre 1983 e 1994, cerca de 39% foram obtidas a partir de produtos naturais ou seus derivados (Francischi, 2005).

Uma das grandes preocupações sobre consumo de plantas medicinais é de que as mesmas, na maioria dos casos, são utilizadas sem orientação médica (Rodrigues et al., 2011). Do ponto de vista científico, algumas pesquisas mostraram que muitas dessas plantas possuem substâncias nocivas e por essa razão devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (Veiga Júnior et al., 2005).

Os efeitos mais preocupantes do uso indiscriminado de plantas medicinais, além dos efeitos adversos comuns descritos em relação às suas várias formas de utilização, é o seu uso durante a gestação, uma vez que os constituintes químicos da planta podem atravessar a placenta, chegar ao feto e podem gerar efeitos teratogênicos, embriotóxicos e abortivos (Veiga Júnior et al., 2005; Rodrigues et al., 2011). Este fator é relevante, pois o uso de plantas medicinais é comum na gestação e neste período a mulher esta especialmente sensível na sua vida e no seu comportamento, abrangendo dimensões socioculturais, históricas e afetivas (Lacroix et al., 2000., Rangel e Bragança, 2011).

Assim como toda a população, as gestantes também utilizam plantas medicinais com frequência. As causas da inclusão desta terapêutica durante a gestação evidenciam o tratamento das manifestações clínicas da própria gravidez (Brum et al., 2011). Diante deste contexto, deve ser levado em consideração o risco/benefício da terapia medicamentosa utilizada, pois se para muitos medicamentos as informações disponíveis são escassas, essa falta de estudos pode ser ainda mais acentuada em relação às plantas medicinais (Macena et al., 2012).

O objetivo primordial do uso de produtos naturais não é substituir medicamentos comercializados e já registrados, mas sim aumentar a opção terapêutica de medicamentos com custo reduzido aos encontrados no mercado farmacêutico, com espectros de ação mais adequados e com indicações terapêuticas complementares as medicações já existentes (Francischi, 2005).

Neste aspecto, o Brasil e a América do Sul destacam-se pela riqueza de sua flora, sendo encontradas inúmeras famílias de plantas com potencial farmacológico a ser investigado. A *Tropaeolum majus* é uma planta nativa dos

Andes, e conhecida popularmente com o nome de chaguinha, capuchinha e nastúrcio. Recentes estudos pré-clínicos realizados em ratos com extratos das folhas de *Tropaeolum majus* mostraram o seu potencial farmacológico, com destaque para sua atividade anti-trombínica (De Medeiros et al., 2000; Santo et al., 2007), anti-inflamatória (Lourenço et al., 2011), diurética e anti-hipertensiva (Gasparotto Junior et al., 2009; 2011b). Além disso, folhas e flores frescas de *Tropaeolum majus* são utilizadas na alimentação, pois possuem uma excelente fonte do carotenoide luteína e vitamina c (Vaz; Jorge, 2006).

Frente às informações sobre os efeitos terapêuticos de *Tropaeolum majus* anteriormente descritos, e considerando que a literatura possui escassas evidências sobre o uso seguro desta planta, o objetivo do presente trabalho foi realizar estudos pré-clínicos de segurança, principalmente durante a gestação e durante períodos críticos de desenvolvimento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas com finalidade terapêutica, para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (Veiga Júnior et al., 2005). A história revela que um número crescente de espécies utilizadas na medicina tradicional vem sendo incorporado às prescrições médicas para o tratamento dos agravos à saúde. Estima-se que o número de espécies vegetais superiores descrito possa chegar a 750.000 e que 119 substâncias químicas extraídas de plantas indicadas para fins medicinais são obtidas aproximadamente de 90 espécies. Desses compostos químicos, cerca de 75% derivam de plantas utilizadas na medicina tradicional (Rangel e Bragança, 2009).

A descoberta de medicamentos a partir de vegetais, o desenvolvimento da etnofarmacologia, da farmacologia experimental e da química de produtos naturais levou ao isolamento, à determinação de estruturas e identificação dos mecanismos de ação de princípios ativos de substâncias como atropina e hioscina (antiespasmódicos), colchicina (anti-reumático), digitálicos (cardiotônicos), ópio (potentes analgésicos), metformina (antidiabético), pilocarpina (antiglaucoma), salicilatos (analgésicos e antiinflamatórios) e reserpina (hipotensor e sedativo) (De Smet, 2004).

Devido ao desenvolvimento de grandes laboratórios farmacêuticos e dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como forma alternativa de tratamento em várias partes do mundo. Porém, observou-se nas últimas décadas a revalorização do emprego de preparações fitoterápicas. Assim, alguns grupos farmacêuticos passaram a desenvolver esforços voltados para o aprimoramento de fitoterápicos e sua produção em escala industrial, diferentemente das formas artesanais que caracterizaram os estágios iniciais de sua utilização (Turolla e Nascimento, 2006). Um indício do renascimento de fármacos derivados de fontes vegetais é o progresso com pesquisas clínicas no campo dos agentes anticancerígenos (taxol, podofilotoxina e camptotecinas) e do antimalárico (artemisina) (Veiga Jr e Pinto, 2005).

Analisando o custo desta categoria de produtos, os países com menor desenvolvimento tecnológico como o Brasil, oferecem integrativa terapêutica bastante promissora para a população. O país é visto em destaque por possuir um terço da flora mundial, além de ser a Amazônia a maior reserva de produtos naturais com ação fitoterápica do planeta. Esta intensa presença vegetal faz com que as pesquisas e o próprio desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos possam ocorrer como destaque no cenário científico mundial (França et al., 2008; Santos et al., 2011).

Nos últimos anos, a comercialização de plantas medicinais vem crescendo 20% em relação aos medicamentos utilizados na medicina convencional (Howell et al., 2006). Mesmo com a globalização da indústria química e a utilização de medicamentos sintéticos, os produtos derivados de plantas medicinais ainda detêm uma significativa parcela do mercado mundial, 14 bilhões de um total estimado de 280 bilhões de dólares, cerca de 5% do mercado mundial de produtos farmacêuticos (Rangel e Bragança, 2009).

Em um estudo realizado no Canadá, 9% dos pacientes que chegam as clínicas médicas mencionaram já ter utilizado algum tipo de medicamento fitoterápico (Xu e Levine, 2008). Nos Estados Unidos da América, este mercado representa 5 bilhões por ano, sendo o setor de mais rápido crescimento no mercado farmacêutico norte americano (Aschwanden, 2001; Destro et al., 2006). Além disso, estudos mostram que cerca de 37% da população adulta deste mesmo país utilizam medicamentos fitoterápicos (Destro et al., 2006). Porém, em outros países de baixo poder econômico como na África, 80% da população dependem do uso de fitoterápicos, os quais representam uma alternativa frente ao elevado custo dos medicamentos sintéticos (Turolla e Nascimento, 2006).

O crescimento mundial do consumo de fitoterápicos estimulou o desenvolvimento de pesquisas etnobotânicas com o intuito de monitorar o seu uso pelas populações. Estas pesquisas, além de abordarem populações tradicionais como indígenas e caiçaras, também investigam populações de cidades e pequenos núcleos urbanos com origem rural. Nestas populações, tem sido observada a utilização das plantas como um dos poucos recursos terapêuticos para tratar suas doenças mais frequentes (Albuquerque e Hanazaki, 2006).

Apesar do sistema de saúde oficial gratuito atualmente estender-se à zona rural, ele não atende adequadamente à demanda e estas populações não possuem poder aquisitivo para ter acesso a um profissional de saúde. Além disso, algumas classes de medicamentos industrializados são caras e as pessoas se rendem à facilidade de se obter as plantas medicinais, que muitas vezes são cultivadas nos quintais de suas casas (Pilla et al., 2006).

Um estudo descritivo realizado pela Universidade Estadual da Paraíba na cidade de Campina Grande verificou o nível de conhecimento dos herbolários em relação às orientações comunicadas a população sobre o uso adequado de plantas medicinais. A pesquisa revelou que 21% dos herbolários obtiveram o conhecimento através do convívio do dia a dia com os amigos; 7% com parentes; 57% receberam as informações dos pais; 7% com pessoas idosas e 7% de forma autônoma, devido ao contato com outros indivíduos nos locais de trabalho (França et al., 2008).

Além disso, outra pesquisa realizada no estado do Rio de Janeiro, envolvendo a análise de formulários preenchidos pela população usuária do sistema de saúde local e profissionais da área de saúde, permitiu verificar que 63% dos entrevistados utilizam as plantas medicinais como forma de tratamento, mesmo com a disponibilidade de medicamentos sintéticos. Nesta mesma pesquisa foi constatada a utilização de plantas como automedicação antes da consulta ao médico, concomitante com o medicamento sintético (55%) e, em muitos casos, substituindo-o (52%), sem o conhecimento do médico (Florêncio e Junior, 2008).

Atualmente, grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias e lojas de produtos naturais, onde preparações vegetais são comercializadas com rotulagem industrializada. Em geral, essas preparações não possuem certificado de qualidade e são produzidas a partir de plantas cultivadas, o que descaracteriza a medicina tradicional que utiliza, quase sempre, plantas da flora nativa (Veiga Junior e Pinto, 2005). Esta facilidade na aquisição de plantas medicinais, desperta em seus usuários uma ideia equivocada em relação ao seu uso, pois acreditam que as plantas sejam inócuas à saúde (Macena et al., 2012). Entretanto, podem ocorrer possíveis efeitos tóxicos com a utilização de pequenas quantidades de plantas medicinais, provavelmente, devido a um excessivo número de componentes

ativos da planta, independentemente de suas formas tóxicas (Al Quara, 2005; Ling et al., 2008, Balbino e Dias, 2010).

Os efeitos tóxicos produzidos por medicamentos a base de plantas medicinais pode parecer trivial, quando comparada com medicamentos convencionais, entretanto é um sério problema de saúde pública, pois as plantas medicinais podem desencadear reações adversas pelos próprios constituintes químicos, devido a interações com outros medicamentos ou alimentos, ou ainda relacionados a características do paciente (idade, sexo, características genéticas, condições fisiológicas e gestação) (Balbino e Dias, 2010).

## 2.2 PLANTAS MEDICINAIS NA GRAVIDEZ

O uso de plantas medicinais é uma alternativa terapêutica comum em populações consideradas sensíveis ou vulneráveis ao uso de medicamentos como idosos, crianças e gestantes. Além disso, diversas plantas são utilizadas durante a gestação e a lactação para o tratamento de distúrbios como ansiedade, hipertensão, cólicas, enjôo, depressão pós-parto e distúrbios do sono (Allaire et al., 2000; Buttar e Jones, 2003).

Em relação ao uso de qualquer medicamento sintético utilizado durante a gestação, deve sempre ser levada em consideração a relação risco/benefício. No entanto, esse mesmo cuidado não é aplicado ao uso de plantas medicinais, podendo desencadear riscos à mãe e ao feto durante todo o período gestacional (Mengue et al., 2001).

Apesar destes riscos, o uso de medicamentos e plantas medicinais durante a gestação é um evento frequente, e as causas de sua utilização incluem o tratamento das desordens clínicas que ocorrem durante o período gestacional, doenças crônicas ou intercorrentes e a própria automedicação (Brum et al., 2011). Além disso, é importante ressaltar que várias plantas medicinais são completamente desconhecidas quanto ao potencial tóxico e que além do vegetal em si, são necessários outros parâmetros para a segurança do uso de plantas medicinais. Mesmo assim, a frequência do uso de plantas medicinais e seus derivados durante a gestação muitas vezes são apoiadas em

propagandas que prometem benefícios seguros (Jurgens, 2003; Silva et al., 2011).

Neste sentido, diversas áreas das ciências estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas como a fitoquímica, que trabalha no isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; a etnobotânica e a etnofarmacologia, buscam informações a partir do conhecimento de diversos povos e etnias; e a farmacologia estuda os efeitos farmacológicos de extratos e dos constituintes químicos isolados (Albuquerque e Hanazaki, 2006).

O uso de plantas medicinais pelas gestantes deve seguir rigorosamente os mesmos cuidados dos medicamentos alopáticos, ou seja, sempre com o conhecimento médico prévio, já que se pôde observar em achados literários o fator embriotóxico, teratogênico e abortivo de muitas espécies (Rodrigues et al., 2011).

A embriotoxicidade se refere à perturbação no desenvolvimento embrionário ou fetal, a custa de efeitos que não afetam o organismo materno (Araujo, 1998). O efeito teratogênico sobre o embrião ou feto em desenvolvimento depende de diversos fatores, destacando-se o estágio de desenvolvimento do conceito, relação entre dose e efeito, genótipo materno fetal e mecanismo patogênico específico de cada agente (Pastuszak et al., 1997; Rodrigues et al., 2011). O aborto é a interrupção da gravidez pela morte do embrião ou feto. A ingestão de plantas para induzir o aborto envolve o risco de intoxicação grave que pode resultar não só a morte, mas também futuras complicações reprodutivas (Moreira et al., 2001; Roehsig et al., 2011).

Dentre as plantas encontradas com efeitos abortivos, embriotóxicos e teratogênicos comprovados, as partes comumente utilizadas são folhas, frutos, cascas dos galhos, flores e raízes variando de planta para planta e de acordo com a sua constituição (Rodrigues et al., 2011). Neste sentido, estudos experimentais realizados em modelos animais, mostram que os períodos críticos a serem evitados são os períodos pré-implantação, pós-implantação e organogênese (Hiremath et al., 1997; Elbetieha et al., 1998; Zeichen de Sa et al., 2000; Boareto et al., 2008; Muller et al., 2009; Marques et al., 2010).

Algumas plantas como angélica (*Angelica archangelica*), sucuuba (*Himanthus sucuba*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), arnica (*Arnica montana*), cânfora (*Cinnamomum canphora*), confrei (*Symphytum officinale* L.),

eucalipto (*Eucaliptus globulus*) e sene (*Cassia angustifolia* e *Cassia acutifolia*) são abortivos, pois podem estimular a motilidade uterina. (Mengue et al., 2001; Veiga Junior et al., 2005).

Estudos realizados em animais durante o período gestacional mostraram que a arruda (Gonzales et al., 2007), barbatimão, cambará, chapéu-de-couro, falso boldo, vidreira, *Rhazya stricta* e *Senecio latifolius* apresentam efeitos que podem ser prejudiciais a gestante e ao conceito; principalmente a arruda (*Ruta graveolens*), que é uma planta abortiva contra indicada durante a gravidez, pois exerce fortes contrações no útero (Mengue et al., 2001; Roehsig et al., 2011; Rodrigues et al., 2011).

Embora as pesquisas realizadas caracterizem os riscos de várias plantas medicinais utilizadas durante a gestação, o seu uso ainda continua frequente. Uma pesquisa realizada com 139 gestantes demonstrou que as espécies que elas mais utilizaram foram: erva cidreira (*Cymbopogon citratus*) (79%), boldo (*Peumus boldus*) (41%), erva-doce (*Pinpinella anisum* L.) (28%), e camomila (*Matricaria recutita* L.) (28%) (Rangel e Bragança, 2009).

A grande maioria dos efeitos tóxicos observados durante a gestação se devem aos grupos de substâncias presentes nas plantas medicinais. Antraquinonas, furanocumarinas, alcalóides pirrolidínicos, quinonas, glicosídeos cianogênicos e flavonóides, são as principais classes envolvidas nos processos embriotóxicos, teratogênicos e abortivos (Capasso et al., 2000).

Vários destes compostos naturais são amplamente distribuídos no reino vegetal e podem promover seus efeitos tóxicos, além dos já anteriormente descritos, através de atividades estrogênicas e antiestrogênicas. Entre estes compostos, destacam-se os flavonóides, pois são encontrados em abundância na família das leguminosas (*Leguminosae*) (Breinholt et al., 2000). Estudos experimentais mostraram que os flavonóides podem promover alterações no perfil hormonal de fêmeas, interferindo com a fertilidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Breinholt et al., 2000; Maciel et al., 2002; Yao et al., 2008).

Os flavonóides são capazes de alterar a atividade das monooxigenases e conseqüentemente o metabolismo dos hormônios esteroidais (Lima et al., 2001). Estudos de estrogenicidade *in vivo* realizados com diversos flavonóides demonstraram a capacidade destas substâncias em alterarem a distribuição do receptor alfa do estrógeno (ER $\alpha$ ) em úteros (Breinholt et al., 2000). Além disso,

alguns flavonóides também promoveram efeitos inibitórios na redução de progesterona para 20 $\alpha$ - hidroxiprogesterona em fígado de ratos (Shimada et al., 2005; Nunes et al.,2010).

As fases de desenvolvimento pré e perinatal são consideradas particularmente críticas, porque as alterações morfológicas e funcionais induzidas nessas fases são normalmente irreversíveis. Além dos efeitos teratogênicos induzidos *in utero*, que na maioria das vezes são diagnosticados precocemente ainda durante a gestação ou ao nascimento, existe uma grande preocupação com distúrbios que podem se manifestar tardiamente, como alterações comportamentais, distúrbios neurodegenerativos, alterações metabólicas e disfunções reprodutivas (WHO, 2002).

Nos últimos anos, extensa atenção tem sido atribuída à exposição perinatal a medicamentos e contaminantes químicos ambientais como base para o surgimento de doenças na fase adulta. Devido a isso, a elevada exposição a substâncias químicas capazes de interferir com o sistema endócrino (desreguladores endócrinos) tem sido apontada como um dos fatores envolvidos no aumento de distúrbios reprodutivos e comportamentais em humanos (Tilson, 1998; Skakebaek et al., 2001; Sharpe, 2001, 2003; Colborn, 2004; Rodrigues et al., 2011).

Estudos realizados com animais indicam que alterações do desenvolvimento sexual podem resultar da exposição a substâncias capazes de mimetizar ou antagonizar hormônios naturais ou interferir com os mecanismos que regulam a disponibilidade desses hormônios (Dalsenter et al.,1997; Gray, 1998; Baker, 2001; Sharpe, 2001, 2003). Nesse contexto, é importante salientar que os processos reprodutivos como a gestação, parturição, lactação e desenvolvimento sexual envolvem uma série de alterações fisiológicas que não limitam as mudanças hormonais, mas envolvem a participação de uma variedade de mediadores químicos, como citocinas inflamatórias, óxido nítrico e fatores de crescimento, que podem ser modificados pela exposição a substâncias químicas (Antunes – Rodrigues e Favaretto, 1999; Norman et al., 2007).

## 2.3 LEGISLAÇÃO

As normas que regulamentam o uso de medicamentos à base de plantas medicinais são de extrema importância para garantir sua eficácia, segurança e qualidade. Os padrões de controle de qualidade das agências reguladoras ainda não estão bem estabelecidos. Várias preparações que utilizam plantas medicinais ainda necessitam de estudos científicos mais detalhados, incluindo padronização química, testes biológicos *in vitro* e em modelos animais e avaliação clínica (Souza-Moreira et al., 2008).

É reconhecido que dados de eficácia e segurança de várias plantas medicinais ainda não são suficientes para dar suporte ao seu uso, por vezes devido à falta de metodologias adequadas de avaliação destas plantas. E, em se tratando de composição, muitas vezes não se tem estabelecido o princípio ativo ou tóxico, sua concentração e seu conhecimento farmacológico e toxicológico (Barata, 2005; Santos et al., 2011).

A busca por marcadores baseia-se na suposição de que qualquer planta possui um ou poucos constituintes responsáveis por sua atividade e que, portanto, substituiriam o uso da planta na sua totalidade, permitindo doseamentos precisos e determinação das variações de bioatividade (Phillipson, 1995; Springfield, 2005). Contudo, vários são os exemplos de que a bioatividade pode ser o resultado do sinergismo entre os constituintes de uma determinada planta. Já foram relatados casos de constituintes tidos como ativos que, quando isolados, apresentaram-se tóxicos para uso humano ou com solubilidade limitada (Liang et al., 2004; Santos et al., 2011).

Com a expansão da utilização de plantas medicinais por grande parte da população, houve um crescimento nas discussões sobre a segurança do seu uso. Na União Européia quando os produtos à base de plantas medicinais são utilizados com finalidade terapêutica, estas plantas são classificadas como medicamentos regulares. Na Alemanha, 40% das prescrições médicas contêm algum derivado de plantas medicinais. Nestes países, para que ocorra este volume de prescrições, são exigidas comprovações de qualidade, eficácia e segurança destes produtos pela European Medicines Agency-EMEA (Scialli, 2008; Santos et al., 2011).

Nos Estados Unidos da América (EUA), os produtos naturais são considerados suplementos alimentares e as empresas que os fabricam são responsáveis pela sua segurança. Entretanto, quando estes produtos são utilizados como medicamentos a regulamentação é feita pela Food and Drug Administration –FDA (Wu, 2008; Marles, 2010).

A população em geral confunde a fitoterapia com o uso de plantas medicinais. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera os derivados de plantas medicinais (extratos, tinturas, óleos e outros) como medicamentos fitoterápicos aqueles obtidos exclusivamente de matérias primas de origem vegetal, com qualidade constante e reprodutível e que tanto os riscos quanto à eficácia sejam caracterizados por levantamentos etnofarmacológicos, documentações técnico científicas em publicações ou ensaios clínicos (Anvisa, 2000; Nicoletti et al., 2007; Santos et al., 2011). Estas normas são baseadas em protocolos de agências regulamentadoras internacionais, como Organization for Economic Cooperation Development – OECD, FDA, EMEA e WHO (Anvisa, 2000, 2010a).

No Brasil, a dispensação de plantas medicinais é privativa das farmácias e ervanárias, observados o acondicionamento adequado e a classificação botânica, entretanto não podem constar indicações do seu uso terapêutico nas embalagens (Anvisa, 2009; Balbino e Dias, 2010). Além disso, plantas medicinais e seus derivados podem ser obtidos na forma de produtos manipulados, industrializados cadastrados como alimentos e cosméticos ou registrados como medicamentos fitoterápicos e medicamentos dinamizados, seguindo as resoluções RDC nº267/2005, RDC nº277/2005, RDC nº278/2005 e RDC nº219/2006 (Balbino e Dias, 2010).

No Brasil, em 2004, foi aprovada a RDC nº48, da ANVISA que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e, entre outros pontos, abrange as etapas de controle de qualidade da droga vegetal, do produto acabado e da importação de fitoterápicos (Anvisa, 2004). Esta RDC foi revogada em 2010 e atualmente encontra-se em vigor a RDC nº 14/2010, que normatiza o registro de medicamentos fitoterápicos. Enquanto a RDC nº4/2009, dispõe as normas de farmacovigilância que notificam as informações referentes aos efeitos adversos relacionados a medicamentos (Anvisa, 2009, Anvisa 2010b).

Dentro deste contexto, foi criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovado pelo Decreto Presidencial de nº5813, de 2006, elaborada pelo Grupo de Trabalho Interministerial (GTI) o qual contempla diretrizes que vão desde a cadeia produtiva de plantas medicinais até os produtos fitoterápicos (Brasil 2006). Essa política fez surgir um novo GTI para elaborar o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos cuja proposta foi submetida à consulta pública e aprovado em 2008, por meio da portaria interministerial nº2960, que além de criar esta GTI, criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com a missão de monitorar e avaliar a implantação da Política Nacional (Santos et al., 2011).

Com a finalidade de instituir o programa Farmácia Viva no Sistema Único de Saúde (SUS) em 2010 foi aprovada a Portaria nº886 do Ministério da Saúde. O programa foi o primeiro de assistência farmacêutica baseado no emprego científico de plantas medicinais desenvolvido no Brasil, tendo por objetivo produzir medicamentos fitoterápicos acessíveis a população e realizar todas as etapas de cultivo, coleta, processamento, armazenamento de plantas medicinais, manipulação, dispensação de preparações magistrais até oficinas de plantas medicinais e produtos fitoterápicos (Simoni, 2011).

De acordo com a RDC nº14/2010, na obtenção do registro de medicamentos fitoterápicos devem ser apresentadas informações através de um relatório técnico sobre a planta incluindo a forma de produção, dados do controle de qualidade, eficácia e segurança do mesmo. Os estudos de eficácia e segurança podem ser comprovados através de pontuação em literatura técnico-científica; ensaios pré-clínicos e clínicos, tradicionalidade do uso e presença na “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” (Anvisa, 2010b).

Pesquisas conduzidas na área de toxicologia reprodutiva e de desenvolvimento são, portanto, necessárias na avaliação dos riscos associados ao uso de plantas medicinais e compostos derivados. A ANVISA tem publicado uma série de normas que dispõem sobre os estudos de segurança e eficácia necessários para o registro de medicamentos fitoterápicos, sendo que a avaliação da toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento é parte integrante dos testes complementares de toxicidade pré-clínica (ANVISA, 1996, 2004a, 2004b).

A Portaria nº 116, de 08 de agosto de 1996 da ANVISA propôs um roteiro para os estudos toxicológicos de fitoterápicos, e em 16 de março de 2004 foi publicada no diário oficial da União a Resolução nº 90: Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Este guia contém os parâmetros mínimos para realização de toxicologia pré-clínica (ANVISA, 1996; ANVISA, 2004), e os testes Complementares fazem parte desse roteiro.

Estão descritos como complementares os seguintes testes:

- Determinação de efeitos adversos sobre a fertilidade e a performance reprodutiva causada por drogas administradas durante a gametogênese e fecundação (uma espécie de mamífero).
- Determinação de efeitos adversos sobre fetos durante a vida intra e extra uterina, por drogas administradas durante a gestação (duas espécies de mamíferos).
- Determinação de efeitos adversos, sobre a mãe e o produto, durante os últimos estágios da prenhez, parto e desenvolvimento pós-natal, por drogas administradas durante este período (uma espécie de mamíferos).
- Determinação de mutagenicidade, se a droga em estudo:
  - a) for usada por longos períodos (acima de um ano).
  - b) ter analogia com substância que se suspeita ou que seja reconhecidamente mutagênica.
  - c) provocar depressão de medula óssea, em doses toleráveis.
  - d) deprimir a gametogênese ou reduzir a fertilidade.
  - e) produzir efeitos cancerígenos.

Deste modo, aqueles medicamentos desenvolvidos a partir de plantas medicinais devem comprovar sua eficácia e segurança através da realização de ensaios farmacológicos pré-clínicos, clínicos e procedimentos de controle de qualidade em toda a sua cadeia produtiva, para que possa garantir seu uso seguro sem riscos à saúde humana.

## 2.4 *Tropaeolum majus* L.

*Tropaeolum majus* L. pertence à família Tropaeolaceae e é uma importante trepadeira anual semi-perene, de hábito herbáceo, com caule circular, folhas inteiras, peltadas, alternas e verdes, com flores axilares em forma de campânula, zigomorfa, cíclicas e hermafroditas grandes e vistosas, variando do amarelo ao vermelho (Figura 1) (Ribeiro et al., 2011). Sua estrutura atinge em média 4,5 x 4,0 cm, e podem chegar a 17,5 x 15,0 cm. O pecíolo é afilado para o ápice, atinge em média 9,0 x 0,5 cm na base e 0,2 cm no ápice, possui superfície estriada, inserção central e é circular em secção transversal (Zanetti et al., 2004). Suas folhas e flores compõem saladas sofisticadas, atraindo a atenção pela ampla gama de atividades medicinais que apresenta (Santo et al., 2007) .



**Figura 1** – *Tropaeolum majus* L. (Foto do Horto de Plantas medicinais da Universidade Paranaense – Unipar).

### 2.4.1 Distribuição

*Tropaeolum majus* é uma importante planta medicinal, amplamente distribuída pelo mundo, sendo esta conhecida popularmente no Brasil como capuchinha, chaguinha ou nastúrcio (Lorenzi e Matos, 2002; Ferreira et al.,

2004; Sangalli et al., 2004). Esta planta é frequentemente encontrada em centros de diversidade primária do sul do México até a Patagônia na Argentina e parte norte do Brasil, sendo cultivada pela rusticidade e a facilidade de adaptação a climas variados (Pivoto et al., 2010). No Brasil, esta espécie vegetal faz parte do projeto de “Produção, processamento e comercialização de plantas medicinais, condimentares e aromáticas” da Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura (EMBRAPA), onde os agricultores recebem treinamento técnico sobre o plantio e o cultivo desta planta para fins alimentares e medicinais (Vaz; Jorge, 2006).

#### 2.4.2 Composição química

Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de ácidos graxos (ácido erúrico, ácido oléico e linoleico) benzil isotiocianato e flavonóides (isoquercitrosídeo, quercetol 3-triglicosídeo e kaempferol) nas sementes e folhas de *Tropaeolum majus* (De medeiros et al., 2000; Mietkiewska et al., 2004; Sangalli et al., 2004; Zanetti et al., 2004). Glicosinolatos (benzilglicosinolatos) foram também isolados das folhas desta planta como a glucotropaeolina, sinalbina e triterpeno tetracíclico. (Kjaer et al., 1978; Lykkesfeld e Meller, 1993; De medeiros et al., 2000; Griffiths et al., 2001).

Os glicosinolatos são  $\beta$  – D – S - glicosídeos aniônicos encontrados em 16 famílias de espécies de plantas dicotiledôneas, incluindo as espécies comestíveis. Em sua forma nativa, os glicosinolatos possuem baixa atividade biológica, mas eles sempre coexistem, em diferentes compartimentos da planta com a mironase que após o dano tecidual hidrolisa-os a compostos bioativos, chamados isotiocianatos. Estes podem ser tóxicos contra fungos, bactérias, insetos e nematóides contidos na planta (Wielanek e Urbanek, 2006).

#### 2.4.3 Estudos em farmacologia e toxicologia com *Tropaeolum majus*

Toda a planta tem sido utilizada há séculos pela medicina popular. As folhas secas ou em infusão da *Tropaeolum majus* são usadas popularmente no Brasil para o tratamento de várias doenças, incluindo desordens

cardiovasculares, infecções do trato urinário, asma e constipação. (Correa, 1978; Ferreira et al., 2004; Sangalli et al., 2004; Ferro, 2006).

Vários estudos retrospectivos em farmacologia experimental foram conduzidos com *Tropaeolum majus*. De Medeiros et al. (2000), reportam atividade antitrombínica de extratos das folhas de *Tropaeolum majus*, preparados com metanol ou cloreto de metileno. Binet (1964) demonstrou que o benzil isoticianato possui efeito antibiótico em infecções do trato urinário. Pintão et al. (1995) provou que benzyl glicosinatos demonstram atividade anticancerígena *in vitro*, contra uma variedade de linhagens de células tumorais em humanos. Picciarelli et al. (1984) e Picciarelli e Alpi (1987) descreveram que o tritepeno de curcubitacina possui atividade antineoplásica.

Nos últimos anos, tem sido crescente a realização de investigações sobre o potencial farmacológico desta planta. Santo et al. (2007) demonstraram atividade anticoagulante através da análise do tempo de trombina (TT) a partir dos extratos preparados das folhas e flores de *Tropaeolum majus*. Lourenço et al. (2011), descreveram atividade anti-inflamatória em modelos de inflamação aguda. Gasparotto Junior et al. (2009, 2011a, 2011b, 2012) mostraram o potencial diurético, hipotensor e anti-hipertensivo através da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e atividade antioxidante das folhas de *Tropaeolum majus*, utilizando o seu extrato bruto, fração purificada e o seu composto majoritário, a isoquercitrina.

No mesmo período em que foram observados os efeitos terapêuticos obtidos por esta planta, paralelamente foram realizados estudos de toxicologia aguda, subcrônica e um ensaio de atividade anti (androgênica) e ou anti (estrogênica), que demonstraram a ausência de toxicidade nos parâmetros avaliados, caracterizando em parte a sua segurança (Zanetti et al., 2003; Gasparotto Junior et al., 2009; Lourenço et al., 2012; Gomes et al., 2012). Entretanto, outra espécie da mesma família, o *Tropaeolum tuberosum*, foi relatada como sendo capaz de reduzir a função testicular em ratos após tratamento com extratos preparados a partir de suas raízes (Cardenas-Valencia et al., 2008). Além disso, tem sido relatado que alguns flavonóides, que são os principais componentes do extrato hidroetanólico de *Tropaeolum majus*, são potenciais compostos ativos que possuem atividade no sistema endócrino (Le Bail et al., 1998).

Estes achados revelam uma ampla variedade dos efeitos de eficácia da *Tropaeolum majus* nos modelos experimentais estudados indicando que esta planta pode se tornar uma importante opção terapêutica. Entretanto, substâncias que interferem no sistema renina angiotensina (SRA), como inibidores da enzima conversora de angiotensina e antagonistas dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, são classificadas como substâncias teratogênicas e tem seu uso restrito durante a gestação (Ganong, 1995; Mastrobattista, 1997; Speth et al., 1999; Alwan et al., 2005)

## 2.5 RISCOS DO USO DOS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA DURANTE A GESTAÇÃO

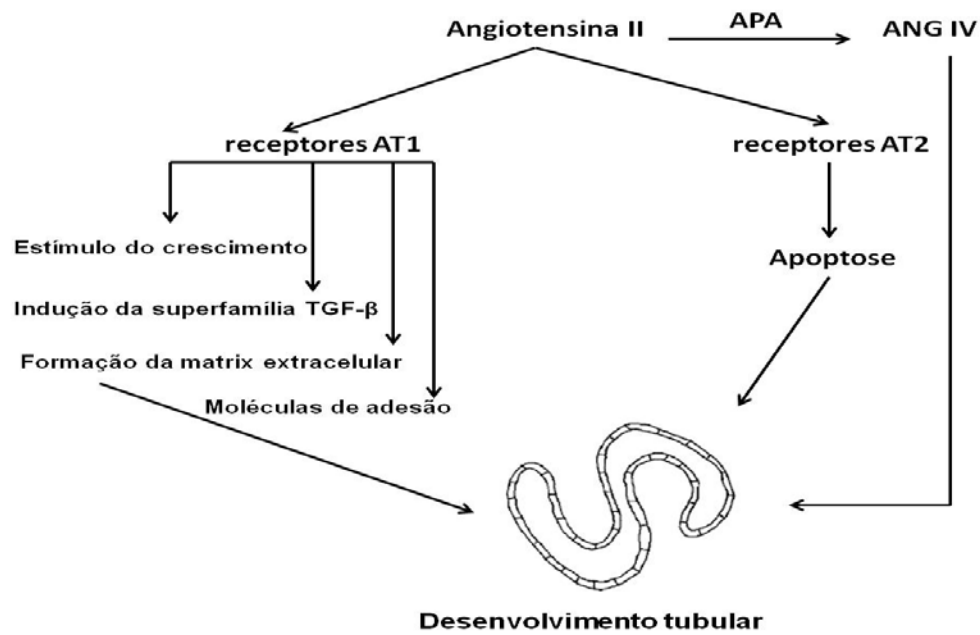
Inibidores da ECA são efetivos e geralmente bem tolerados grupos de medicamentos utilizados para o controle da hipertensão e nefropatia diabética (Cooper et al., 2006; Citrin-Diav et al., 2011). Além disso, são descritos como a primeira linha de medicamentos para o controle da hipertensão em mulheres não grávidas, embora os bloqueadores dos receptores da angiotensina sejam amplamente utilizados nos últimos anos (Moretti et al., 2011). Por outro lado, os inibidores da ECA são contra indicados durante o segundo e terceiro trimestre de gravidez por estarem associados com características de efeitos adversos fetais (Cooper et al., 2006; Moretti et al., 2011) Estudos *in vitro* tem demonstrado que os inibidores da ECA atravessam a barreira placentária de humanos e ovelhas. Existem evidências em estudos realizados com animais de que a administração de inibidores da ECA durante a gestação esteja associada com toxicidade fetal e o aumento de óbito dos animais ao nascimento (Citrin-Diav et al., 2011).

Os efeitos adversos relacionados ao feto incluem anormalidades fetais esqueléticas no crânio, falha e disfunção renal no feto e em neonatos, oligodrânio, hipoplasia pulmonar, hipotensão fetal e neonatal e restrição do crescimento intrauterino (Mastrobattista, 1997, Citrin-Diav et al., 2011). Estes efeitos estão associados à participação dos receptores da angiotensina I (AT<sub>1</sub>) e angiotensina II (AT<sub>2</sub>) que possuem um importante papel no desenvolvimento e crescimento fetal, pois o receptor AT<sub>2</sub> é amplamente expresso nos tecidos

para o desenvolvimento fetal, mas rapidamente diminui após o nascimento (Speth, 1999; Alwan et al., 2005).

Existem trabalhos mostrando que o uso dos inibidores da ECA utilizados durante o primeiro trimestre de gestação não estão relacionados a todos os efeitos adversos descritos nos segundo e terceiro trimestres de gestação (Mastrobattista, 1997; Cooper et al., 2006). No primeiro trimestre são descritos somente anúria e oligodrâmnio, com conseqüente prejuízo da função renal (Cooper et al., 2006). Entretanto, estudos recentes realizados no primeiro trimestre de gestação descrevem um aumento do risco de malformações no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central em filhos de mães que fizeram uso dos inibidores da ECA no período descrito (Alwan et al., 2005; Citrin-Diav et al., 2011).

Outras correntes de estudos mostraram que os efeitos adversos que ocorrem no primeiro trimestre de gestação, descritos anteriormente, não são tão evidentes comparados aos demais períodos gestacionais porque a conversão da Ang I para Ang II ocorre de forma independente da ECA, pois existe a participação de uma via alternativa para este processo que envolve a participação da enzima aminopeptidase (APA) e enzima conversora de agiotensina do tipo 2 (ECA 2) (Alwan, 2005; Harata et al., 2006). Atualmente os inibidores da ECA são classificados, segundo a FDA, com fator de risco D durante a gestação que é caracterizado por riscos ao feto e outros grupos de drogas que atuam no SRA como os bloqueadores dos receptores da AngII e os inibidores de renina, possuem risco equivalente em relação aos efeitos adversos ao feto anteriormente descritos (Podymow e August, 2008).



**Figura 2: Esquema dos efeitos de Angiotensina II no desenvolvimento tubular renal: AT<sub>1</sub>:** Receptor da angiotensina do tipo1. **AT<sub>2</sub>:** Receptor da angiotensina do tipo2. **TGF- $\beta$ :** Fator de transformação do crescimento. **ANG IV:** Angiotensina IV.

Fonte: Wolf (2002).

### 3. HIPÓTESES

A hipótese deste trabalho foi baseada principalmente nas evidências dos efeitos antiinflamatórios, hipotensores e antihipertensivos dos extratos obtidos das folhas de *Tropaeolum majus* e do seu metabólito primordial isoquercitrina, descritos na literatura através de mecanismos envolvendo a via da lipoxigenase e a inibição da ECA, pois até o presente momento, não existem informações sobre o seu uso seguro em ensaios de desregulação endócrina, seus efeitos na contratilidade uterina, ou durante o período gestacional e suas consequências sobre o feto.

Em relação aos ensaios de atividade (anti) estrogênica ou (anti) androgênica, nós propomos que os extratos não interfiram nestes ensaios, pois a planta apresenta vários constituintes químicos além do flavonóide majoritário que podem impedir sua ligação aos receptores hormonais. Sobre seu efeito sobre a contratilidade uterina, nós acreditamos que os mecanismos da planta propostos não inibam a síntese de prostaglandinas, pois os mecanismos biológicos descritos da planta envolvem a inibição da lipoxigenase e da ECA, que inibem a síntese de leucotrienos e aumentam a síntese de prostaglandinas respectivamente. Porém, se os extratos de *Tropaeolum majus* inibirem a ECA, espera-se que eles produzam efeitos tóxicos durante a gestação.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis atividades desreguladoras endócrinas de *Tropaeolum majus*, seus efeitos sobre a contratilidade uterina, e seus possíveis efeitos adversos durante a gestação.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o possível efeito de *Tropaeolum majus* sobre a contratilidade uterina; *ex vivo*;
- Investigar a possível ação estrogênica ou antiestrogênica de *Tropaeolum majus* através do teste uterotrófico;
- Investigar a possível ação androgênica ou antiandrogênica de *Tropaeolum majus* através do teste de Hershberger;
- Investigar os possíveis efeitos adversos sobre a gestação, além de possíveis alterações hormonais nas progenitoras expostas a *Tropaeolum majus* durante a gestação;

## 5 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

No presente estudo determinamos as doses utilizadas a partir da maior dose (300mg/kg) em que o extrato hidroetanólico de *Tropaeolum majus* (EHTM) apresentou atividade farmacológica (diurética) em ratos (Gasparotto Junior et al., 2009). Todo o material utilizado, as metodologias e as técnicas empregadas, bem como os resultados e a discussão específica dos dois estudos que compõem esta tese estão descritos nos manuscritos apresentados nos itens 5.1 e 5.2.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional da UFPR (número de autorização 389).

5.1 - Artigo 1 - Screening for *in vivo* (anti) estrogenic and (anti) androgenic activities of *Tropaeolum majus* L. and its effect on uterine contractility. Publicado no Journal of Ethnopharmacology, em 13 de março de 2012.

Journal of Ethnopharmacology 141 (2012) 418–423



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)



### Screening for *in vivo* (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of *Tropaeolum majus* L. and its effect on uterine contractility

Emerson Luiz Botelho Lourenço<sup>a,b</sup>, Juliane Centeno Muller<sup>b</sup>, Ana Claudia Boareto<sup>b</sup>, Caroline Gomes<sup>b</sup>, Ana Carolina Lourenço<sup>b</sup>, Bruna Minatovicz<sup>b</sup>, Sandra Crestani<sup>b</sup>, Arquimedes Gasparotto Jr.<sup>a</sup>, Anderson Joel Martino-Andrade<sup>c</sup>, Paulo Roberto Dalsenter<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biological Sciences Medical and Health, University Paranense, Umuarama, PR, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>c</sup> Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

**Screening for *in vivo* (anti) estrogenic and (anti) androgenic activities of  
*Tropaeolum majus* L. and its effect on uterine contractility**

**Emerson Luiz Botelho Lourenço<sup>a, b</sup>; Juliane Centeno Muller<sup>b</sup>; Ana Claudia Boareto<sup>b</sup>; Caroline Gomes<sup>b</sup>; Ana Carolina Lourenço<sup>b</sup>; Bruna Minatovicz<sup>b</sup>; Sandra Crestani<sup>b</sup>; Arquimedes Gasparotto Junior<sup>a</sup>; Anderson Joel Martino-Andrade<sup>c</sup> and Paulo Roberto Dalsenter<sup>b\*</sup>**

<sup>a</sup>Institute of Biological Sciences Medical and Health, University Parananense, Umuarama, PR, Brazil

<sup>b</sup>Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>c</sup>Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

\* Corresponding author:

E-mail: pdalsenter@ufpr.br (Paulo Roberto Dalsenter)

Department of Pharmacology,

Federal University of Paraná,

PO – Box 19031 - 81531-990 Curitiba/PR, Brazil.

## Abstract

*Ethnopharmacological relevance:* *Tropaeolum majus* L. (Tropeaeolaceae) is a medicinal herb popularly used in Brazil for treatment of inflammatory and cardiovascular diseases. Despite some published data on its efficacy, there are still few toxicological data describing the safety of this plant. The aim of this study was to evaluate the (anti)estrogenic and (anti)androgenic activity of the hydroethanolic extract obtained from *Tropaeolum majus* L. (HETM), as well as its possible effects on uterine contractility.

*Material and methods:* Three experimental protocols were performed, (a) uterotrophic assay, (b) Hershberger assay and (c) an *ex vivo* test to investigate the effects of maternal administration of HETM on uterine contractility at the end of pregnancy. In all protocols three doses of the HETM were administered to Wistar rats: 3, 30 and 300mg /kg.

*Results:* *In vivo* tests for detection of (anti)androgenic and (anti)estrogenic activities did not show any significant alterations. Similarly, no alterations were observed on uterine contractility induced by oxytocin and arachidonic acid.

*Conclusions:* HETM was unable to produce (anti)estrogenic or (anti)androgenic activities in the short-term *in vivo* screening assays performed. In addition, there was no evidence that HETM can affect uterine contractility following gestational exposure of rats.

**Keywords:** *Tropaeolum majus*; reproductive toxicology; medicinal herbs; rats

## 1. Introduction

Medicinal herbs are widely used for treatment of several diseases, as well as for research and development of new drugs. There are over 20,000 species being used in traditional medicine and these are potential sources for discovery of new therapeutic compounds (Gupta et al., 2008). Historically, in folk medicine, different ethnic groups have used alternative therapies for treatment of diseases or as alimentary supplement. The widespread use of medicinal plants is partly due to the low toxicity attributed to these natural products (Ling et al., 2008). However, medicinal plants may cause a series of toxic effects, including metabolic disorders, alterations in immune and endocrine system, hepatic toxicity and behavioral effects (Buttar and Jones, 2003; Jurgens, 2003; Gadano et al., 2006). Due to this evidence, the FDA (Food and Drug Administration) describes that when a plant is used to heal, treat or prevent some human disease, this will be classified as a drug, and the suppliers must provide scientific evidence that the product is effective and safe for human use (Wu et al., 2008).

*Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) is a native plant of the Andes in South America and it is widely distributed around the world. In Brazil, it is popularly known as “chaguinha”, “capuchinha” and “nastúrcio” (Ferreira et al., 2004; Ferro, 2006). It has been used by the population in form of tea made from its leaves for treatment of several conditions, including inflammatory processes, high blood pressure, edema and genitourinary tract infections (Corrêa et al., 2001; Lorenzi and Matos, 2002).

Phytochemical studies detected the presence of fatty acids, benzyl isothiocyanate and flavonoids in seeds and leaves of *Tropaeolum majus* (*T. majus*) (De Medeiros et al., 2000; Mietkiewska et al., 2004; Zanetti et al., 2004). Glucosinolates were isolated from leaves of this plant, as well as tetracyclic triterpenes (Lykkesfeldt and Moller, 1993; De Medeiros et al., 2000; Griffiths et al., 2001; Kleinwachter et al., 2008). Several studies in experimental pharmacology have been performed with *T. majus* L or compounds isolated from it. Binet (1964) demonstrated that benzyl isothiocyanate possesses antimicrobial activity in genitourinary infections. Pintão et al. (1995) showed that benzyl glucosinolate isolated from *T. majus* have *in vitro* anticancer activity in

several human tumor cell lineages. Likewise, Picciarelli et al. (1984) and Picciarelli and Alpi (1987) demonstrated that the triterpene curcubitacin has antineoplastic activity. De Medeiros et al. (2000) described antithrombotic effect of some extracts of *T. majus* L. leaves. More recently, studies from Gasparotto Junior et al., 2009; 2011a; 2011b demonstrated diuretic and antihypertensive activity of the ethanolic extract of *Tropaeolum majus* (HETM), purified fraction and a flavonoid, isoquercitrin, from the leaves of *T. majus* L. Nevertheless, despite many studies on the pharmacological properties of *T. majus* L., several aspects of its safety have not yet been thoroughly studied (Wielanek and Urbanek, 2006). Recently, another species of the same family, *T. tuberosum*, was reported as being able to reduce testicular function in rats following treatment with extracts prepared from the roots (Cardenas-Valencia et al; 2008). In addition, it has been reported that some flavonoids, which are major components of the hydroethanolic extract of *T. majus*, are potential endocrine active compounds (Le Bail et al., 1998).

In the last decades, there has been growing concern over the effects of either synthetic or natural products on the endocrine systems of humans and wildlife. The so-called endocrine disruptors can affect development, reproduction, metabolism, immunity and several other hormonally dependent processes. Identification of potential endocrine disruptive properties of medicinal herbs has become significantly important, particularly because of the wide acceptance and use of such products by sensitive populations, including children and pregnant women. The aim of the present study was to investigate the possible (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of the hydroethanolic extract from leaves of *T. majus* (HETM) in short-term *in vivo* screening tests, as well as the effects of the extract in an *ex vivo* assay of uterine contractility.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Wistar rats were obtained from the Federal University of Parana and maintained in controlled conditions at  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  and a constant 12h light/dark cycle. Standard pellet food (Nuvital, Curitiba/PR, Brazil) and tap water were available *ad libitum*. All animal studies were carried out in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals adopted by the Federal University of Parana (Protocol number: 383).

### 2.2. Plant Material

*T. majus* L. leaves were collected in June 2009 from the botanical garden of University Paranaense (UNIPAR), at 430m altitude above sea level ( $\text{S}23^{\circ}47'55''\text{--W}53^{\circ}18'48''$ ). The plant was identified and voucher specimens were deposited at the Herbarium of this University under number 2230.

### 2.3. Preparation of the hydroethanolic extracts of *T. majus* (HETM)

*T. majus* L. leaves were air – dried in an oven at  $40^{\circ}\text{C}$  for 4 days and the resulting dry plant was cut and pulverized. This plant material was macerated for 7 days using 90% ethanol as solvent. The solvent was then eliminated by a rotary vacuum evaporator under reduced pressure and lyophilized, representing a yield of 15.5% of the dry material extracted.

### 2.4. Drugs

17- $\alpha$ -ethynylestradiol (95% pure;  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$ ) and testosterone propionate (97% pure;  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_3$ ) was obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Tamoxifen (tamoxifen citrate, 99.5% pure;  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}$ ) was obtained from Galena Laboratory (Curitiba/PR, Brazil) and Flutamide was purchased from Galena (São Paulo/SP, Brazil).

### 2.5 Uterotrophic assay

The uterotrophic assay have been routinely used to investigate possible (anti)estrogenic activities of different compounds (Ashby et al., 1997; Odum et al., 1997). Immature female rats, aged  $21 \pm 1$  day, were randomly assigned to different experimental groups and were treated daily for three consecutive days with HETM (3, 30 and 300 mg /kg/ day). In addition, one group was treated with distilled water to serve as negative control, while another group received 17- $\alpha$ -ethynylestradiol (dose of 0.4 mg /kg /day by gavage) and was used as a positive control for estrogenicity (Andrade et al., 2002). The possible antiestrogenic activity was tested by administration of the same three doses of HETM (3, 30 and 300 mg /kg /day) to female rats previously treated with 17- $\alpha$ -ethynylestradiol. The last group received tamoxifen (dose of 10 mg /kg /day by gavage) after 17- $\alpha$ -ethynylestradiol and served as positive control for antiestrogenicity. Twenty-four hours after the last treatment, animals were weighed and sacrificed by cervical dislocation (AVMA, 2007). Uteri were excised, trimmed free of fat, pierced, and blotted to remove fluid. The body of each uterus was cut just above its junction with the cervix and at the junction of the uterine horns with the ovaries. Wet uterus weight was determined and expressed as relative weight (wet uterus weight x 100 /body weight).

### 2.6. Hershberger assay

For the Hershberger assay, 7-week-old male rats were castrated via the scrotum (midline incision) under anesthesia (ketamine 75 mg /kg/ and xylazine 1.5 mg /kg; i.p). Chemical treatment was not commenced until 7 days after castration to allow for complete recovery. Seven-week-old rats (peripubertal) were chosen as this is the typical age used in several studies (Ashby and Lefevre, 2000; Yamada et al., 2001).

The HETM was given daily for 7 consecutive days by either oral gavage (p.o.) or subcutaneous injection (s.c.). For assessment of (anti) androgenicity, three doses of HETM (3, 30 and 300 mg /kg/ day) were administered orally to castrated animals and to testosterone-treated males (testosterone propionate

0.25 mg/ kg/ day; s.c.). For detection of androgenicity, the same doses of the HETM were administered orally to castrated males treated with vehicle (canola oil 1.0 mL/ kg/ day; s.c.). Animals treated with the vehicle by either oral gavage (5.0 mL/ kg/ day) or subcutaneous injection (1.0 mL/ kg /day) were used as negative controls for androgenicity, while castrated rats administered testosterone propionate (0.25 mg /kg/ day; sc) and vehicle (5.0 mL /kg/ day p.o.) were used as positive controls for androgenicity. Flutamide (10.0 mg /kg/ day; s.c.) given to castrated, testosterone-treated males (testosterone propionate 0.25 mg /kg /day; sc), which also received the vehicle (canola oil 5.0 mL /kg/ day; p.o.), was used as a positive control for antiandrogenicity. The dosing volume for all solutions was 5.0 mL /kg when using the oral route and 1.0 mL /kg when using subcutaneous injections. One day after the final administration, all rats were weighed and sacrificed by cervical dislocation after deep anesthesia (Ketamine). At necropsy, the prostate, seminal vesicle without fluid, levator ani/bulbocavernosus muscle (LABC) and glans penis were carefully dissected free of adhering fat and weighed. All organs were weighed and their masses expressed as relative weights (organ weight /body wt x 100).

### *2.7 Effect on the contractility of isolated pregnant rat uterus*

Adult female rats were mated for three hours during the dark cycle at the proportion of three females to each male. Vaginal smears were collected daily and the day of sperm detection was considered as day 0 of gestation. Pregnant rats were treated daily from day 8 to 21 of pregnancy with HETM (3, 30 and 300 mg /kg /day) and sacrificed at day 21 of pregnancy by deep ketamine anesthesia. The uterus was immediately removed, placed in nutritional liquid Krebs-Henseleit, and cleaned of fat and excessive connective tissue. The uterus and the myometrium were transversally sectioned in strips of approximately 5 mm of length at the central portion of each uterine horn, and each of the two obtained strips was submitted to different experimental conditions. Uterine strips were placed in a 10 mL organ bath containing nutritional liquid Krebs-Henseleit maintained at 32 °C and continuously aerated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Uterine strips were subjected to an optimal resting force of 1g and 60 minutes of stabilization. The uterine strips were initially

submitted to contraction with KCl (80 mM) to verify the viability of the tissue, and the response was considered as 100%. After 30 min, tissues were directly stimulated with arachidonic acid (0.3 mM) or oxytocin (10 mUI/ ml). In between curves, a time of 30 min was respected and the nutritional solution was renewed every 10 min. Contractile isotonic responses of uterine strips were recorded using a Kymograph and converted into percentage, compared with KCl response. This procedure was repeated twice to allow a medium value for the contraction induced by oxytocin and arachidonic acid. The nutritional liquid Krebs-Henseleit presents the following composition (concentrations in mM): NaCl (133), KCl (5.0), CaCl<sub>2</sub> (2.5), MgSO<sub>4</sub> (1.3) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2), NaHCO<sub>3</sub> (20) and glucose (10).

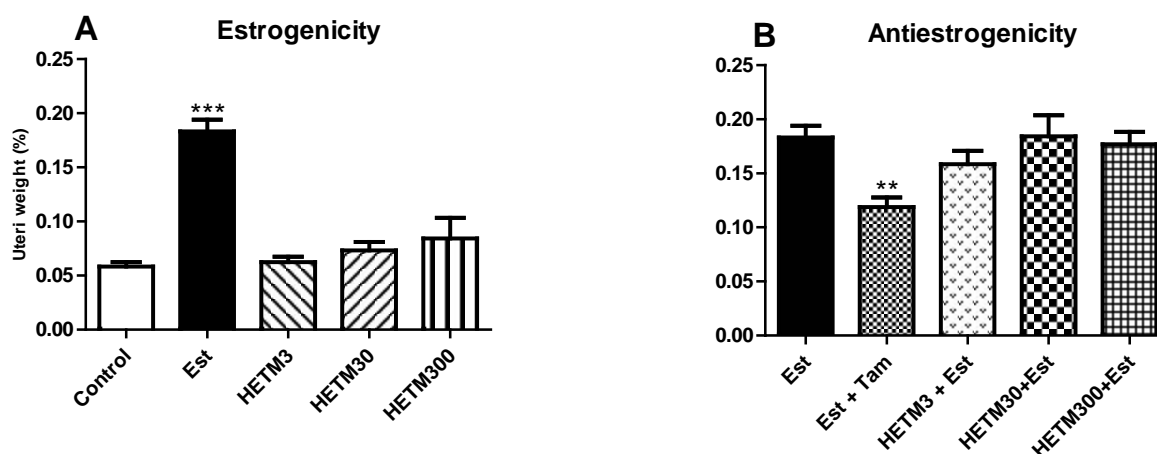
### *3. Statistical analysis*

Parametric data were analyzed by variance analysis (ANOVA) and differences between groups were assessed by Bonferroni's test. Nonparametric data were analyzed by Kruskals-Wallis followed by Dunn's test. Differences were considered to be statically significant at a probability level of 5% ( $p < 0.05$ ). Preparation of graphs and statistical analysis was carried out using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 4. Results

### 4.1. Uterotrophic assay

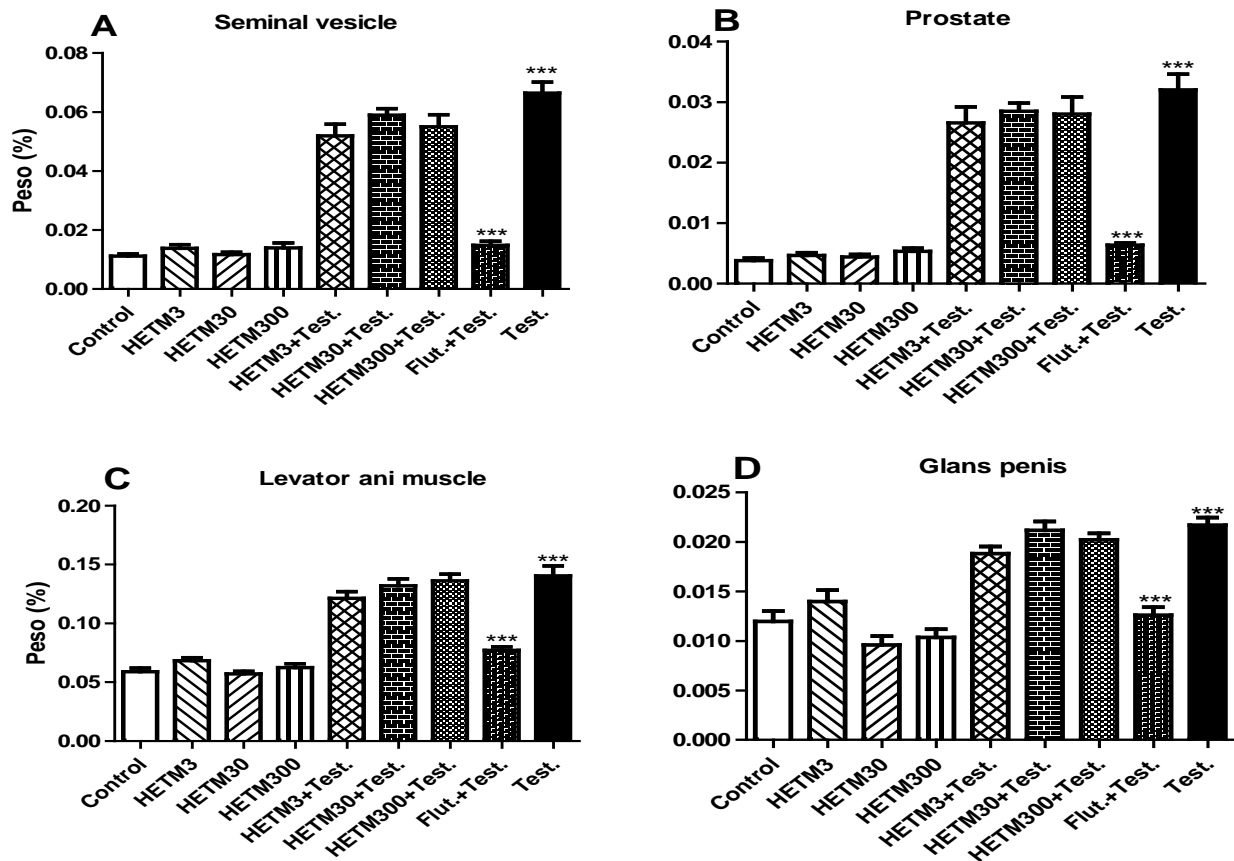
Regarding the relative weight of the uterus there were no significant differences between the groups that received HETM and vehicle (Figure 1 A). Administration of 17- $\alpha$ -ethinyl estradiol (positive control) significantly increased uterine weight, but coadministration with HETM was unable to block this uterotrophic activity (Figures 1A and 1B). On the other hand, coadministration of 17- $\alpha$ -ethinyl estradiol and tamoxifen resulted in a significant reduction in uterine weight when compared to the group receiving only 17- $\alpha$ -ethinyl estradiol.



**Figure 1** – Test for estrogenicity and antiestrogenicity (uterotrophic assay). Columns represent mean  $\pm$  standard error of the relative uterus weight of immature females rats. (n= 11 animals per group). \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  (one-way ANOVA followed by Bonferroni test). Est= Estradiol (1  $\mu$ g/kg); Tam= Tamoxifen (10 mg/kg); HETM= Hydroethanolic Extract of *Tropaeolum majus*.

#### 4.2. Hershberger assay

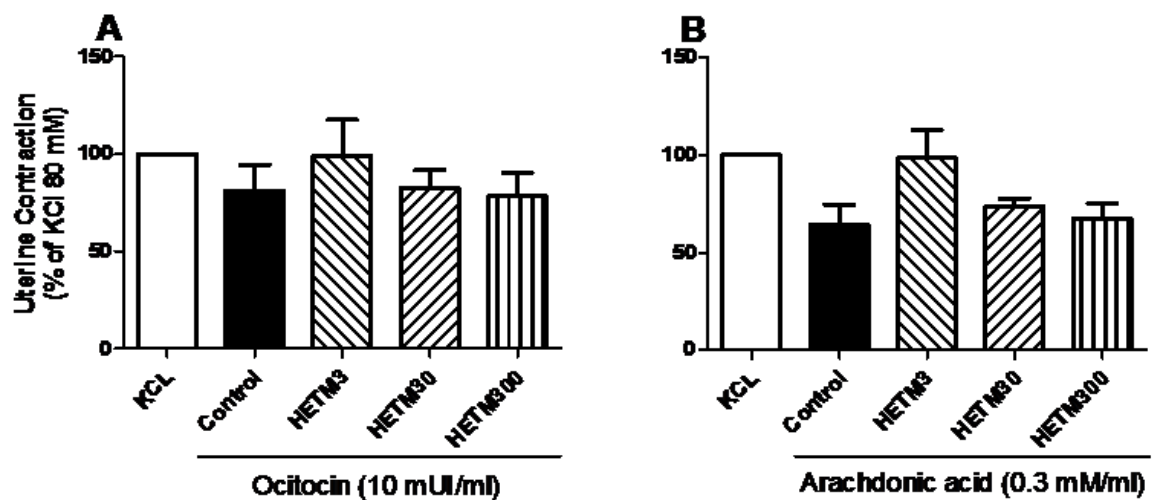
The data in Figure 2 A-D illustrate the results of Hershberger test. The results demonstrate that the weight of androgen dependent organs (seminal vesicle, prostate, LABC and glans penis) of HETM groups did not differ from vehicle control group. HETM was also unable to block the testosterone-induced growth of these tissues. Anti-androgenic effects were observed only when testosterone-treated animals were co-treated with flutamide, a classic androgen receptor antagonist.



**Figure 2** – Test for androgenicity and antiandrogenicity (Hershberger assay). Columns represent mean  $\pm$  standard error of the seminal vesicle, ventral prostate, levator ani/bulbocavernosus muscle and glans penis relative weights. (n= 8 - 11 animals per group). \*\*\*  $p < 0.001$  (one-way ANOVA followed by Bonferroni test). Test= Testosterone (0.25 mg/kg); Flut= Flutamide (10 mg/kg).

#### 4.3. Effect on the contractility of isolated pregnant rat uterus

The treatments performed with HETM in pregnant female rats from gestational day 8 to 21 did not alter the response of uterine contractility induced by oxytocin or arachidonic acid in all tested doses, indicating lack of modulatory effects of HETM on rat uterus. (Figure 3 A and B).



**Figure 3** - Effect of the HETM on uterine contractility induced by arachidonic acid (0.3 mM) (A) and oxytocin (10mUI/ml) (B). Female rats were exposed to HETM from day 8 to 21 of pregnancy. Columns represent mean  $\pm$  standard error of the percentage relative to KCl response. (n =5 animals per group) (Kruskals-Wallis followed by Dunn's test).

#### 4. Discussion and conclusions

In the last decade, several studies have reported some important biological effects of *T. majus* L. On the other hand, few studies have given emphasis on possible toxic effects caused by this species. In this regard, recently was demonstrated that oral administration of up to 5 g /kg of infusion or hydroethanolic extract obtained from the leaves of *T. majus* did not cause signs of acute toxicity in normotensive rats (Zanetti et al., 2003; Gasparotto Junior et al., 2009). Thus, the objective of the present work was to extend the safety data of this species through investigation of possible (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of the hydroethanolic extract obtained from the leaves of *T. majus* L. (HETM), as well as its effect on uterine contractility.

Some studies performed *in vivo* and *in vitro* with *Tropaeolum tuberosus*, a member of the Tropaeolaceae family, showed reductions in testosterone levels, as well as decreased binding of estradiol to its receptor, when the extract obtained from the roots of this species was tested (Johns et al., 1982; Cardenas-Valencia et al., 2008). In addition, root extracts of *Tropaeolum tuberosus* reduced the testicular function of adult rats after 12, 21 and 42 days of treatment (Cardenas-Valencia et al., 2008). On the other hand, benzyl isothiocyanate, a major component *T. majus*, *T. tuberosus* and cruciferous vegetables, did not change pregnancy outcomes following rat exposure during pre- and post-implantation periods (Adebiyi et al., 2004). Corroborating these findings, the results obtained here did not demonstrate any changes in tissues that are sensitive to the action of sex steroid hormones in males and females rats.

A recent pharmacological and phytochemical study performed with *T. majus* L. revealed that flavonoids, particularly isoquercitrin, are major components of the hydroethanolic extract (Gasparotto Junior et al., 2011b). Previously, *in vitro* studies performed with flavonoids in lineages of breast cancer MCF-7 cells (hormone dependent), in the absence or presence of estradiol, revealed estrogenic and antiestrogenic responses, depending on flavonoid and concentration tested (Le Bail et al., 1998). Isoquercitrin, the major flavonoid in the HETM, did not produce a clear dose-dependent curve, but reduced MCF-7 cell proliferation at the highest concentration tested (50  $\mu$ M)

either alone or in the presence of estradiol (Le Bail et al., 1998). More recently, a research performed with the same MCF-7 cells and isoquercitrin confirmed this antiproliferative effect (Yang and Liu, 2009).

In the past years, several *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the anti-inflammatory potential of isoquercitrin (Fernandez et al., 2005; Rogerio et al., 2007). These studies, associated with the popular use of *T. majus* L. leaves to treatment of acute inflammation, make its use in pregnant women an appealing possibility (Rehecho et al., 2011). In the same way, Gasparotto Junior et al. (2009) suggest that the effect of one or more active components of *T. majus* partially facilitates the release of renal prostaglandins in male and female rats. This information led us to investigate the possible effects of the HETM on the contractility of isolated pregnant rat uterus. With demonstrated, the data indicate that treatment of pregnant rats with HEMT does not affect the *ex vivo* uterine contractility induced by oxytocin or arachidonic acid.

The uterotrophic assay did not reveal any change in uterine weight following treatment with HETM at 3, 30 and 300 mg/kg/day either isolated or in combination with estradiol, when compared to appropriate controls. These results indicate lack of *in vivo* estrogenic or anti-estrogenic activity of the HETM. At the end of pregnancy there is a rise in estrogen levels and a decline in the amount of progesterone, which ultimately result in upregulation of oxytocin receptors in the uterus, increased production of prostaglandins and increased uterine contractility (Muller et al., 2009). Taken together the results indicate that *T. majus* does not modulate estrogen responses *in vivo*, as well as has no obvious influence on uterine contractility.

In addition to absence of effects in the uterotrophic assay, the results with castrated male rats (Hershberger assay) indicate that the HETM is unable to elicit androgenic activities at tested doses. Also, HETM cannot block the effects of testosterone on androgen-sensitive tissues such as prostate, seminal vesicle, glans penis and levator ani/bulbocavernosus muscle. However, it is important to mention that in addition to substances that disturb the normal interaction of hormones and their receptors, adverse effects in the reproductive tract can be elicited by compounds that induce alterations in synthesis, storage, release, transport or excretion of endogenous hormones (US EPA, 1996). Most *in vitro* and *in vivo* assays designed to screen endocrine disruptors, including

the uterotrophic and Hershberger assays, are mainly suitable to detect classic receptor-mediated activities and may fail to recognize substances that change endogenous hormone bioavailability to responsive cells (Andrade et al., 2002).

Despite the presence of flavonoids, which have been reported as potential endocrine active compounds, HETM was unable to produce (anti)androgenic or (anti)estrogenic activities in the short-term *in vivo* screening assays performed in the present study. In addition, there was no evidence that HETM can affect uterine contractility following gestational exposure of rats. Additional studies should be performed with *T. majus* L. and its major flavonoid, isoquercitrin, to fully determine the absence of reproductive and developmental toxicity.

### **Acknowledgements**

We are grateful to CAPES, CNPq and DEGPP/UNIPAR for financial support.

### **References**

- Adebiyi, A., Adaikan, P.G., Prasad, R.N.V., 2004. Pregnancy outcomes following pre- and post-implantation exposure of Sprague-Dawley rats to benzyl isothiocyanate. *Food and Chemical Toxicology* 42, 715-720.
- Andrade, A.J., Araujo, S., Santana, G.M., Ohi, M., Dalsenter, P.R., 2002. Screening for *in vivo* (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of technical and formulated deltamethrin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 35, 379-382.
- Ashby, J., Lefevre, P.A., 2000. The peripubertal male rat assay as an alternative to the Hershberger castrated male rat assay for the detection of anti-androgens, oestrogens and metabolic modulators. *Journal of Applied Toxicology* 20, 35-47.
- Ashby, J., Lefevre, P.A., Odum, J., Tinwell, H., Kennedy, S.J., Beresford, N., Sumpter, J.P., 1997. Failure to confirm estrogenic activity for benzoic acid and clofibrate: implications for lists of endocrine-disrupting agents. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 26, 96-101.

- AVMA (Association American Veterinary Medical), 2007. Guidelines on Euthanasia. Michigan, pp. 1-36.
- Binet, L., 1964. A biologist physician in the country. *Biology and Medicine Journal* 53, 5-28.
- Buttar, H.S., Jones, K.L., 2003. What do we know about the reproductive and developmental risks of herbal and alternate remedies? *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 68, 492-493.
- Cardenas-Valencia, I., Nieto, J., Gasco, M., Gonzales, C., Rubio, J., Portella, J., Gonzales, G.F., 2008. *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) reduces testicular function: effect of different treatment times. *Andrologia* 40, 352-357.
- Corrêa, A.D., Batista, R.S., Quintas, L.E.M., 2001. *Plantas medicinais: do cultivo a terapêutica*, 4 ed. Vozes, Petrópolis.
- De Medeiros, J.M., Macedo, M., Contancia, J.P., Nguyen, C., Cunningham, G., Miles, D.H., 2000. Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 157-165.
- Fernandez, J., Reyes, R., Ponce, H., Oropeza, M., Vancalsteren, M.R., Jankowski, C., Campos, M.G., 2005. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. *European Journal Pharmacology* 522, 108-115.
- Ferreira, R.B.G., Vieira, M.C., Zárete, N.A.H., 2004. Análise de crescimento de *Tropaeolum majus* 'jewel' em função de espaçamentos entre plantas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 7, 57-66.
- Ferro, D., 2006. *Fitoterapia: conceitos clínicos*. Atheneu, São Paulo.
- Gadano, A.B., Gurni, A.A., Carballo, M.A., 2006. Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 246-251.
- Gasparotto Junior, A., Boffo, M.A., Lourenco, E.L., Stefanello, M.E., Kassuya, C.A., Marques, M.C., 2009. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum*

- majus* (Tropaeolaceae) in rats. Journal of Ethnopharmacology 122, 517-522.
- Gasparotto Junior, A., Gasparotto, F.M., Boffo, M.A., Lourenco, E.L., Stefanello, M.E., Salvador, M.J., da Silva-Santos, J.E., Marques, M.C., Kassuya, C.A., 2011a. Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin-An active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. Journal of Ethnopharmacology 134, 210-215.
- Gasparotto Junior, A., Gasparotto, F.M., Lourenco, E.L., Crestani, S., Stefanello, M.E., Salvador, M.J., da Silva-Santos, J.E., Marques, M.C., Kassuya, C.A., 2011b. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. Journal of Ethnopharmacology 134, 363-372.
- Griffiths, D.W., Deighton, N., Birch, A.N., Patrian, B., Baur, R., Stadler, E., 2001. Identification of glucosinolates on the leaf surface of plants from the Cruciferae and other closely related species. Phytochemistry 57, 693-700.
- Gupta, D., Bleakley, B., Gupta, R.K., 2008. Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses. Journal of Ethnopharmacology 115, 361-380.
- Johns, T., Kitts, W.D., Newsome, F., Towers, G.H., 1982. Anti-reproductive and other medicinal effects of *Tropaeolum tuberosum*. Journal of Ethnopharmacology 5, 149-161.
- Jurgens, T.M., 2003. Potential toxicities of herbal therapies in the developing fetus. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology 68, 496-498.
- Kleinwachter, M., Schnug, E., Selmar, D., 2008. The glucosinolate-myrosinase system in nasturtium (*Tropaeolum majus* L.): variability of biochemical parameters and screening for clones feasible for pharmaceutical utilization. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 11165-11170.
- Le Bail, J.C., Varnat, F., Nicolas, J.C., Habrioux, G., 1998. Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. Cancer Letters 130, 209-216.

- Ling, S., Nheu, L., Dai, A., Guo, Z., Komesaroff, P., 2008. Effects of four medicinal herbs on human vascular endothelial cells in culture. *International Journal of Cardiology* 128, 350-358.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Instituto Plantarum, São Paulo.
- Lykkesfeldt, J., Moller, B.L., 1993. Synthesis of benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L. (isothiocyanates as potent enzyme inhibitors). *Plant Physiology* 102, 609-613.
- Mietkiewska, E., Giblin, E.M., Wang, S., Barton, D.L., Dirpaul, J., Brost, J.M., Katavic, V., Taylor, D.C., 2004. Seed-specific heterologous expression of a nasturtium FAE gene in *Arabidopsis* results in a dramatic increase in the proportion of erucic acid. *Plant Physiology* 136, 2665-2675.
- Muller, J.C., Botelho, G.G., Bufalo, A.C., Boareto, A.C., Rattmann, Y.D., Martins, E.S., Cabrini, D.A., Otuki, M.F., Dalsenter, P.R., 2009. *Morinda citrifolia* Linn (Noni): *in vivo* and *in vitro* reproductive toxicology. *Journal of Ethnopharmacology* 121, 229-233.
- Odum, J., Lefevre, P.A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E.J., Beresford, N.A., Sumpter, J.P., Ashby, J., 1997. The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25, 176-188.
- Picciarelli, P., Alpi, A., 1987. Embryo-suspensor of *Tropaeolum majus*: Identification of gibberellin A<sub>63</sub>. *Phytochemistry* 26, 329-330.
- Picciarelli, P., Alpi, A., Pistelli, L., Scalet, M., 1984. Gibberellin-like activity in suspensors of *Tropaeolum majus* L. and *Cytisus laburnum* L. *Planta* 162, 566-568.
- Pintão, A.M., Pais, M.S., Coley, H., Kelland, L.R., Judson, I.R., 1995. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of benzyl isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*. *Planta Medica* 61, 233-236.

- Rehecho, S., Uriarte-Pueyo, I., Calvo, J., Vivas, L.A., Calvo, M.I., 2011. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 75-85.
- Rogério, A.P., Kanashiro, A., Fontanari, C., da Silva, E.V., Lucisano-Valim, Y.M., Soares, E.G., Faccioli, L.H., 2007. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Research* 56, 402-408.
- Wielanek, M., Urbanek, H., 2006. Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86, 177–186.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 1996. Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. EPA/630/R-96/009, Washington, pp. 1–163.
- Wu, K.M., Ghantous, H., Birnkrant, D.B., 2008. Current regulatory toxicology perspectives on the development of herbal medicines to prescription drug products in the United States. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2606-2610.
- Yamada, T., Sunami, O., Kunimatsu, T., Kamita, Y., Okuno, Y., Seki, T., Nakatsuka, I., Matsuo, M., 2001. Dissection and weighing of accessory sex glands after formalin fixation, and a 5-day assay using young mature rats are reliable and feasible in the Hershberger assay. *Toxicology* 162, 103-119.
- Yang, J., Liu, R.H., 2009. Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-beta-d-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 8581-8586.
- Zanetti, G.D., Manfron, M.P., Hoelzel, S.C.S., 2004. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). *IHERINGIA Série Botânica* 59, 173-178.

Zanetti, G.D., Manfron, M.P., Hoelzel, S.C.S.M., Pagliarin, V.P., Morel, A.F., 2003. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. Acta Farmaceutica Bonaerense 22, 159-162.

5.2 - Artigo 2 - Toxicity of *Tropaeolum majus* L. in critical periods of pregnancy in Wistar rats. Submetido ao Journal of Ethnopharmacology, em 15 de agosto de 2012.

Journal of Ethnopharmacology x Elsevier Editorial SystemTM x

ees.elsevier.com/jep/default.asp

**Journal of ETHNOPHARMACOLOGY**

Contact us Help ?

Username: Lourenço  
Role: Author

Submissions Being Processed for Author Emerson Luiz Botelho Lourenço, Msc

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

| Action                       | Manuscript Number | Title   |
|------------------------------|-------------------|---|
| <a href="#">Action Links</a> |                   | Toxicity of Tropaeolum majus L. in critical periods of pregnancy in Wistar rats |

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

| Initial Date Submitted | Status Date | Current Status       |
|------------------------|-------------|----------------------|
| 15/08/2012             | 15/08/2012  | Submitted to Journal |

Display 10 results per page.

**Toxicity of *Tropaeolum majus* L. in critical periods of pregnancy in Wistar rats**

Emerson Luiz Botelho Lourenço<sup>a, b\*</sup>; Juliane Centeno Muller<sup>b</sup>; Ana Claudia Boareto<sup>b</sup>; Caroline Gomes<sup>b</sup>; Ana Carolina Lourenço<sup>b</sup>; Bruna Minatovicz<sup>b</sup>; Thiago Bruno Lima Prando<sup>a</sup>, Karla Moraes Rocha Guedes<sup>a</sup>, Arquimedes Gasparotto Junior<sup>a</sup>; Anderson Joel Martino-Andrade<sup>c</sup> and Paulo Roberto Dalsenter<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biological Sciences Medical and Health, University Paranaense, Umuarama, PR, Brazil

<sup>b</sup>Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>c</sup>Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

\* Corresponding author: Emerson Lourenço

Laboratory of Toxicology and Cardiovascular Pharmacology

Universidade Paranaense – Praça Mascarenhas de Moraes s/n – Centro, Caixa Postal 224,

Umuarama-PR 87.502-210, Brazil. Tel.: + 55 44 3621 2828;

E-mail address: emerson@unipar.br

## Abstract

*Ethnopharmacological relevance:* *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) is a medicinal herb popularly used in Brazil that has its hypotensive effect by inhibiting the angiotensin-converting enzyme (ACE). The aim of the present study was to investigate the effects of the hydroethanolic extract obtained from *Tropaeolum majus* L. (HETM) during critical periods of pregnancy in Wistar rats. *Material and methods:* Pregnant Wistar rats ( $\pm$  90 days old) were treated orally with HETM at doses of 3, 30 and 300 mg/kg and reproductive assessment in the pre-implantation (from day 1° to 7° of gestation) and post-implantation (from day 8° to 20° of gestation) period was investigated. At the end of each period of gestation the rats were euthanized and evaluated the following reproductive parameters. Pre-implantation period: number of corpora lutea and implants, absolute and relative weight of the uterus, ovaries, kidneys, adrenals, serum estradiol and progesterone levels. Post-implantation period: absolute and relative weights of liver and uterus, litter size, fetal weights, number of viable fetuses, number of resorptions and histological parameters of the kidneys of fetuses.

*Results:* In pre-implantation period were observed significant pre-implant losses and increased levels of estradiol in all treatments when compared with the control group. In post-implantation period were observed a significant reduction in fetal weight in males and females. Additionally, kidney histological analysis showed dilated tubules and cysts in glomerular tufts.

*Conclusions:* The toxic effects of hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* (HETM) during the pre-implantation period may be associated with increased levels of estradiol. Furthermore, the observed changes in fetal weights and renal morphology observed in pos-implantation period are due to a possible reduction in the levels of angiotensin II that has an important role in proto-oncogenes activation and renal maturation.

**Keywords:** *Tropaeolum majus*; reproductive toxicology; teratology; pregnancy

## 1. Introduction

A series of epidemiological studies on the use of medicinal herb in pregnancy show the risk of exposure to the fetus. The risk factor increases when medicinal plants are used as alternative therapy for disorders that occur during pregnancy as abdominal pain, cramps, anxiety, depression and hypertension. In addition, there are few studies of efficacy and safety that have the documentation of the quality needed to be able to restrict the use of plants in critical periods of gestation (Holst et al., 2009; Louik et al., 2010). Recent data show that approximately 75-80% of the population worldwide uses medicinal plants, especially in developing countries due to easy access and the belief that this type of therapy does not cause serious adverse effects (Tabassum, 2011).

Hypertension is one of the most prevalent medical disorders that occur during pregnancy. The National High Blood Pressure Education Program of the NHLBI classifies hypertensive disorders of pregnancy into following categories: gestational hypertension, chronic hypertension, preeclampsia, and preeclampsia superimposed on preexisting hypertension (Podymow and August, 2008; Mustafa et al., 2012). In the literature is well described the risks that some groups of antihypertensive drugs cause when used during pregnancy; among these, stand out diuretics and inhibitors of renin angiotensin system. However, these drugs can still be used depending on the clinical risk factor for hypertension diagnosed during pregnancy (Podymow and August, 2008). Because of this evidence, there is an increasing use of natural products during the pregnancy, not only because of hypertension, but also as sedatives, vasodilators, among others (Conover, 2003; Louik et al, 2010).

Recent *in vivo* and *in vitro* studies conducted with medicinal plants show diuretic, hypotensive and vasodilators effects. In addition, many species can inhibit the activity of the renin angiotensin system additionally to other pharmacological properties. However, several studies do not have the information necessary for its safe use during pregnancy (Nordeng et al., 2010; Tabassum, 2011).

*Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) is a native plant of the Andes in South America and it is widely distributed around the world. In Brazil, it is popularly known as chaguinha (Ferreira et al., 2004; Ferro, 2006). Recently, *in*

*vivo* studies with hydroethanolic extract obtained from *Tropaeolum majus* (HETM) leaves showed the diuretic and hypotensive effect by inhibiting the angiotensin converting enzyme (ACE) (Gasparotto Junior et al., 2009; 2011). Furthermore, pre clinical toxicology studies conducted with HETM in trials of endocrine disruption or sub chronic exposure, do not showed sign of toxicity in all parameters evaluated (Gomes et al., 2012; Lourenço et al., 2012).

Angiotensin converting enzymes inhibitors (ACEIs) are a group of compounds used for the control of hypertension. However, there is evidence that the toxic effects of ACEIs during pregnancy are associated with fetal toxicity and an increase in stillbirths. The use of ACEIs in humans during late pregnancy has been associated with a characteristic fetopathy including renal dysplasia, oligohydramnios, hypocalvaria, limb contractures, pulmonary hypoplasia and intrauterine growth restriction (Citrin-Diav et al., 2011). Moreover, some studies over the years have reported the physiologic involvement of the renin-angiotensin system in the reproductive system of mammals. In this sense, the renin, angiotensinogen, ACE and its related peptides (angiotensin II and I including their receptors AT1 and AT2) can play an important regulatory role in the ovary on thecal and granulosa cells (Ganong, 1995; Sepht et al., 1999; Pena et al., 2010), including steroidogenesis, ion fluxes, follicular growth and maturation, ovulation, angiogenesis and neovascularization and apoptosis (Speth et al., 1999; Pena et al., 2010).

Although the primary data of literature describing the relative safety of using *Tropaeolum majus* in both males and females rats, there are no evidence about the risk of toxicity during pregnancy. So, the aim of present study was to investigate the effects of HETM during critical periods of pregnancy in Wistar rats.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals*

Female Wistar rats were obtained from colony of Federal University of Parana and maintained in controlled conditions at  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  and a constant 12h light/dark cycle. Standard pellet food (Nuvital, Curitiba/PR, Brazil) and tap water were available ad libitum. All experimental procedures adopted in this study were previously approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Parana (Protocol number: 383).

### *2.2. Plant Material*

*Tropaeolum majus* leaves were collected from the botanical garden of University Paranaense (UNIPAR), at 430m altitude above sea level ( $\text{S}23^{\circ}47'55\text{--}53^{\circ}18'48$ ). The plant was identified and voucher specimens were deposited at the Herbarium of this University under number 2230.

### *2.3. Preparation of the hydroethanolic extracts of Tropaeolum majus (HETM)*

*Tropaeolum majus* leaves were air – dried in an oven at  $40^{\circ}\text{C}$  for 4 days and the resulting dry plant was cut and pulverized. This plant material was macerated for 7 days using 90% ethanol as solvent. The solvent was then eliminated by a rotary vacuum evaporator under reduced pressure and lyophilized, representing a yield of 15.5% of the dry material extracted.

### *2.4. Substances and doses*

The HETM was dissolved in distilled water and administered by gavage in a volume of 5 mL/kg. In each study, three doses of HETM were used (3, 30 and 300 mg/kg/day). Dose selection was based on previous studies showing diuretic and antihypertensive effects of HETM at 300 mg/kg/day in normotensive and SHR rats (Gasparotto Junior et al., 2009; Gasparotto Junior et al., 2011b).

### *2.5. Mating procedure*

Three female rats were placed in a cage with one male during the dark period for mating. On the subsequent morning, vaginal smears were obtained from all females and examined. Females showing sperm in the vaginal smears were housed in individual cages, and this was considered day 0 of pregnancy.

### *2.6. Evaluation of the implantation period GD (gestational days) 1-7*

Female rats were weighed daily during pregnancy following HETM treatment during GD 1-7 and clinical signs of intoxication were also monitored during the treatment period. Immediately after euthanasia (sodium pentobarbital 150 mg/ kg; i.p.) at the 8<sup>o</sup> pregnancy day, selected organs were removed and weighed, including the uterus, liver, kidneys and adrenal glands. Organ weights were reported as absolute and relative weights (organ weight/body weight x 100). The uterus was examined macroscopically with the aid of a magnifying glass to record the number of implantation sites and were counted and the number of corpora lutea. The percentage of pre-implantation losses was calculated as the number of implants by subtracting the number of corpora lutea.

### *2.7. Evaluation of the post implantation period GD 8-20*

Maternal body weights were measured on 0, 5, 10, 15 and 20 pregnancy days and the dams were evaluated for gain of corporal mass (considering that mass of day 0 of pregnancy as 100%). At the 20<sup>o</sup> pregnancy day the dams were euthanized, and selected organs were removed and weighed (liver and uterus), being reported as absolute and relative weight. The following data also were recorded: pregnancy length, implantations number, resorption number and fetus weight. In addition, post implantation losses ( $[(\text{number of implants} - \text{number of live offspring}) \times 100 / \text{number of implants}]$ ) were evaluated.

## *2.8. Processing of kidneys fragment and histopathological analyses*

The kidneys were removed from the fetus at the end of 20 pregnancy days and stored immediately in neutral buffered formalin (10%). These tissue samples were dehydrated in alcohol, cleared with xylene and embedded in paraffin. Later, they were sectioned (5  $\mu$ m), stained with hematoxylin and eosin and examined under light microscope. The samples were analyzed to identify general structural changes in this organ. The analyses were focused on immature tubules and glomeruli, concentric rings, dilated tubules, cystic glomeruli, mitotic figures, cortical/medullary differentiation, apoptose and cystic glomerular tufts. All experimental findings were classified as score: absent (-), discrete 1-5 (+), moderate 6-10 (++) and evident > 10 (+++).

## *2.9. Dosage of estradiol and progesterone*

Pregnant rats were treated daily with HETM on GD 1–7 and euthanized on GD 8 for blood collection. Blood was collected after decapitation and heparin was used as anticoagulant. Plasma was removed after centrifugation and kept at -20 °C until analysis. Estradiol and progesterone was measured using a microparticle enzyme immunoassay (AxSYM Abbott). Kits were purchased from Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, USA). The results were expressed as pg/ml and ng/ml respectively.

## *2.10. Statistical analysis*

Parametric data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. Nonparametric data were analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. Parametric data was expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M) and the non-parametric data, was expressed as proportion or percentage. Proportions were evaluated by the chi-square test (chi<sup>2</sup>-test). Differences were considered to be statically significant at a probability level of 5% ( $p < 0.05$ ) and 1% ( $p < 0.01$ ). Preparation of graphs and

statistical analysis was carried out using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### **3. Results**

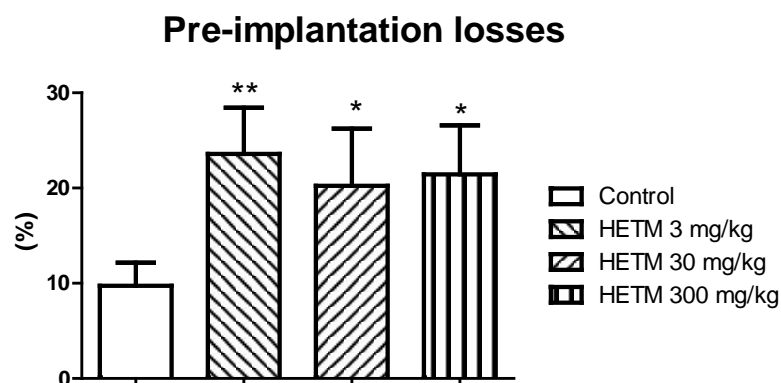
#### *3.1. HETM induces pre-implantation losses and increases estradiol levels in GD 1-7 period*

Dams treated with HETM did not show any sign of maternal toxicity. Expected weight gain occurred in all groups during pregnancy (data not shown). Organ weight (uterus, ovaries, liver, kidneys and adrenal gland) did not differ significantly among groups (Table 1). Furthermore, no clinical or behavioral changes were observed in the animals treated with all doses of HETM. Moreover, in pre-implantation period were observed significant pre-implant losses (Figure 1) and increased estradiol levels (Figure 2A) at all doses tested (HETM 3, 30 and 300 mg/kg).

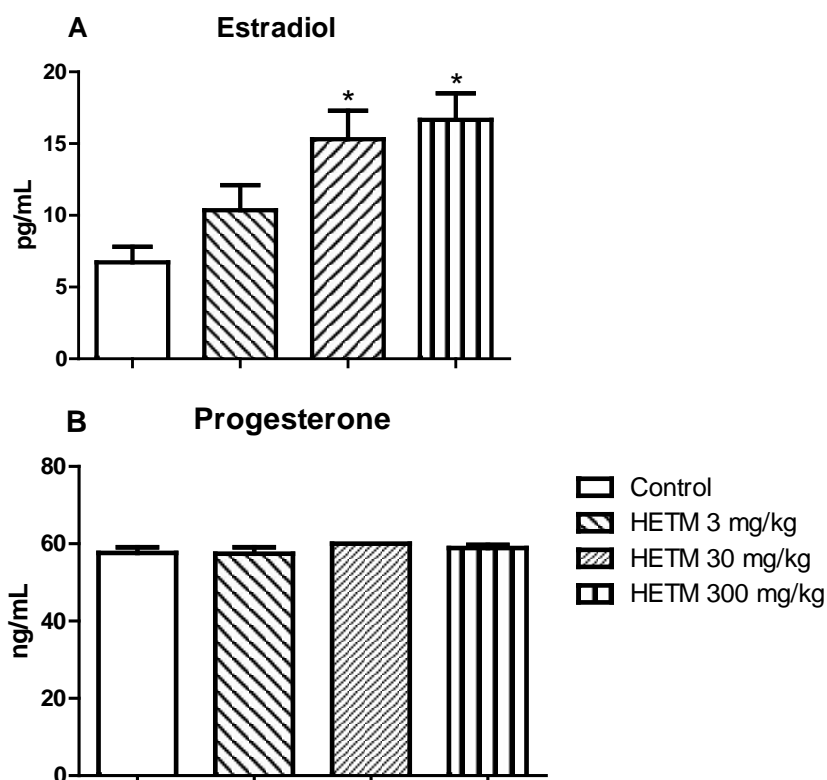
Table 1: Female Wistar rats outcome of dams treated daily with *Troapeolum majus* extract from day 1 to 7 of pregnancy.

| Variable                       | Vehicle   | <i>Troapeolum majus</i> extract (mg/Kg) |           |            |
|--------------------------------|-----------|---|-----------|------------|
|                                |           | 3 mg/Kg                                 | 30 mg/Kg  | 300 mg/Kg  |
| <b><i>Parturient Dams</i></b>  | 15        | 11                                      | 13        | 15         |
| <b><i>Body weights (g)</i></b> | 261±4.25  | 259±4.81                                | 265±4.84  | 258±3.84   |
| <b>ABSOLUTE ORGANS WEIGHTS</b> |           |   |           |            |
| <b><i>Liver (g)</i></b>        | 10.1±0.21 | 9.51±0.27                               | 10±0.18   | 9.77±0.30  |
| <b><i>Kidneys (g)</i></b>      | 0.81±0.01 | 0.79±0.02                               | 0.78±0.01 | 0.80±0.02  |
| <b><i>Adrenals (mg)</i></b>    | 19.4±1.18 | 18.5±1.42                               | 16.6±1.15 | 18.4±1.18  |
| <b><i>Ovaries (mg)</i></b>     | 27.1±0.93 | 29.1±2.44                               | 27.1±1.12 | 27.6±1.36  |
| <b><i>Uterus (mg)</i></b>      | 731±44.15 | 665±63.15                               | 707±56.23 | 663±44.09  |
| <b>RELATIVE ORGANS WEIGHTS</b> |           |   |           |            |
| <b><i>Liver (%)</i></b>        | 3.86±0.05 | 3.66±0.09                               | 3.77±0.06 | 3.78±0.09  |
| <b><i>Kidneys (%)</i></b>      | 0.31±0.01 | 0.30±0.01                               | 0.29±0.01 | 0.31±0.01  |
| <b><i>Adrenals (%)</i></b>     | 0.01±0.01 | 0.01±0.01                               | 0.01±0.01 | 0.01±0.01  |
| <b><i>Ovaries (%)</i></b>      | 0.01±0.01 | 0.01±0.01                               | 0.01±0.01 | 0.01±0.01  |
| <b><i>Uterus (%)</i></b>       | 0.28±0.01 | 0.025±0.02                              | 0.26±0.02 | 0.025±0.02 |

Values are means ± S.E.M



**Figure 1** - Percentage of pre-implantation losses in relation to the total number of corpora lutea in female Wistar rats treated orally with HETM from day 1 to 7 of pregnancy (n= 10 - 14 animals per group). \*\* p<0.01 and \*p <0.05 (chi – square test).



**Figure 2** – Plasma estradiol (A) and progesterone (B) levels of female Wistar rats treated orally with HETM (3, 30 and 300 mg/Kg) from day 1 to 7 day of pregnancy (n= 10-14 animals per group). \* p<0.05 (one-way ANOVA followed by Bonferroni test).

### 3.2. Overall weight of the fetus is affected after treatment with HETM in GD 8-20

The data in Table 2 and 3 illustrate the results in post-implantation period. The results demonstrate that HETM did not alter body weight gain or absolute and relative weight of uterus and liver of rats during pregnancy (Table 2). Additionally, the data show no difference in the number of implants, total resorption and post-implantation losses (Table 3). While not affecting the anterior genital distances (AGD) (Table 3), HETM treatment reduced the weight of the fetus (males and females) at doses of 30 and 300 mg/kg, and similarly reduced the weight of male and female fetuses when evaluated each gender separately.

Table 2: Female Wistar rats outcome of dams treated daily with *Troapeolum majus* extract from day 8 to 20 of pregnancy.

| Variable                       | Vehicle   | <i>Troapeolum majus</i> extract (mg/Kg) |           |           |
|--------------------------------|-----------|---|-----------|-----------|
|                                |           | 3 mg/Kg                                 | 30 mg/Kg  | 300 mg/Kg |
| <b>Partuient Dams</b>          | 10        | 11                                      | 12        | 10        |
| <b>Body weights (g)</b>        | 388±6.56  | 370±8.79                                | 361±12.22 | 354±8.38  |
| <b>ABSOLUTE ORGANS WEIGHTS</b> |           |   |           |           |
| <b>Liver (g)</b>               | 15.8±0.53 | 15.4±0.32                               | 14.7±0.88 | 14.1±0.64 |
| <b>Uterus (g)</b>              | 68.6±2.04 | 63.6±3.57                               | 52.8±6.13 | 62.5±2.69 |
| <b>RELATIVE ORGANS WEIGHTS</b> |           |   |           |           |
| <b>Liver (%)</b>               | 4.07±0.09 | 4.15±0.08                               | 4.04±0.14 | 3.95±0.12 |
| <b>Uterus (%)</b>              | 17.6±0.45 | 17.1±0.03                               | 14.2±1.46 | 17.6±0.64 |

Values are means ± S.E.M.

Table 3: Fetuses from dams treated with *Tropaeolum majus* 8-20 day of pregnancy.

| Variable                                  | Vehicle   | <i>Tropaeolum majus</i> extract (mg/Kg) |                          |                          |
|---|-----------|---|--------------------------|--------------------------|
|   |           | 3 mg/Kg                                 | 30 mg/Kg                 | 300 mg/Kg                |
| <b>Partuient Dams</b>                     | 10        | 11                                      | 12                       | 10                       |
| <b>Number of implants</b>                 | 12.4±0.37 | 11.5±0.69                               | 10.4±1.02                | 11.9±0.65                |
| <b>Total Resorption<br/>(mean/Litter)</b> | 0         | 0.09±0.09                               | 0.66±0.35                | 0.10±0.10                |
| <b>Post-implantation<br/>losses (%)</b>   | 0         | 0.78±0.20                               | 7.20±0.38                | 0.85±0.17                |
| <b>WEIGHT OF FETUS</b>                    |           |   |                          |                          |
| <b>Fetuses Males (g)</b>                  | 3.42±0.02 | 3.38±0.02                               | 3.24±0.02 <sup>a,b</sup> | 3.27±0.03 <sup>a,b</sup> |
| <b>Fetuses Females (g)</b>                | 3.20±0.03 | 3.22±0.02                               | 3.09±0.03 <sup>b</sup>   | 3.06±0.03 <sup>a,b</sup> |
| <b>A.G.D/males (µm)</b>                   | 3.30±0.02 | 3.30±0.02                               | 3.29±0.02                | 3.22±0.02                |
| <b>A.G.D/Females (µm)</b>                 | 1.53±0.02 | 1.53±0.02                               | 1.55±0.02                | 1.50±0.03                |

Values are expressed as mean ± S. E. M. of 10 to 12 rats in each group in comparison with the control (a) or when compared with the hydroalcoholic extract of *T. majus* 3 mg/kg (b) using one-way ANOVA followed by Bonferroni test ( $p^* < 0.05$ ). (AGD) Anogenital distance

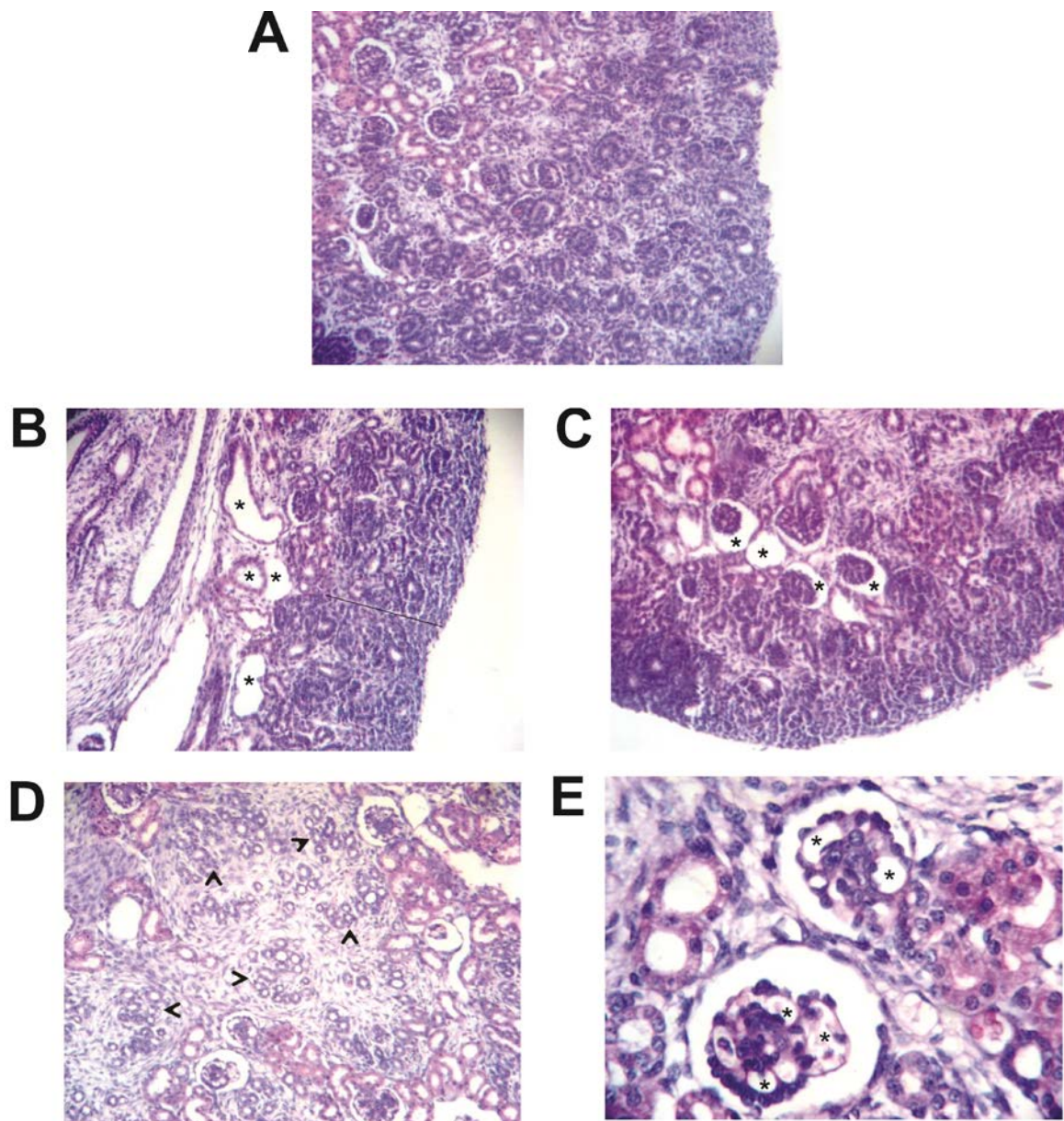
### 3.3. Morphology of the fetal kidney is changed after treatment with HETM

Histopathological alterations in the kidneys of the fetuses were observed at all doses of HETM (Table 4). The histological sections showed marked morphological alterations such as dilated tubules and several cysts in the glomerular tufts of fetuses exposed to HETM during pregnancy (Figure 3).

Table 4: Kidneys of fetuses exposed to *Tropaeolum majus* 8-20 day of pregnancy.

| Renal histological parameters                         | Vehicle | <i>Tropaeolum majus</i> extract (mg/Kg) |                               |                               |
|---|---------|---|-------------------------------|-------------------------------|
|   |         | 3 mg/Kg                                 | 30 mg/Kg                      | 300 mg/Kg                     |
| <b><i>Immature tubules</i></b>                        | (++)    | (++)                                    | (++)                          | (++)                          |
| <b><i>Immature glomeruli</i></b>                      | (+)     | (++)                                    | (++)                          | (++)                          |
| <b><i>Concentric rings</i></b>                        | (+)     | (+++)                                   | (+++)                         | (+++)                         |
| <b><i>Dilated tubules</i></b>                         | (-)     | (-)                                     | (++)                          | (++)                          |
| <b><i>Cystic glomeruli</i></b>                        | (-)     | (++)                                    | (++)                          | (++)                          |
| <b><i>Mitotic figures</i></b>                         | (++)    | (+)                                     | (++)                          | (++)                          |
| <b><i>Cortical medullary/<br/>differentiation</i></b> | no      | yes                                     | yes                           | yes                           |
| <b><i>Apoptose</i></b>                                | no      | no                                      | yes                           | yes                           |
| <b><i>Other</i></b>                                   | no      | no                                      | Cystic<br>glomerular<br>tufts | Cystic<br>glomerular<br>tufts |

Score: absent (-), discrete 1-5 (+), moderate 6-10 (++) evident > 10 (+++)



**Figure 3** – A) Image of the kidneys of fetuses in the control group; H-E. Obj 10x; B) Moderate dilation tube (asterisks) and immature tubules area (row) consisting of columnar epithelial cells in the periphery of the cortical region.(HETM 30 mag/Kg) H-E. Obj 10x; C) Dilatation of the urinary spaces moderate number of clusters (asterisks) (HETM 30 mag/Kg). H-E. Obj 20x; D) Moderate amount of concentric rings (arrowheads) in the spinal region. (HETM 30 mag/Kg) H-E. Obj 10x; E) Dilatation of glomerular tufts (asterisks) (HETM 30 mag/Kg). H-E. Obj. 40x.

#### 4. Discussion and conclusions

Several studies in the literature have demonstrated the absence of acute and subchronic toxicity of the *Tropaeolum majus* extracts in animal models (Zanetti et al., 2003; Gasparotto Jr et al., 2009, Gomes et al., 2012). Likewise, *Tropaeolum majus* was unable to produce (anti)estrogenic or (anti)androgenic activities in the short-term *in vivo* screening assays performed (Lourenço et al., 2012). However, despite *Tropaeolum majus* to possess anti-inflammatory and diuretic activity in Wistar rats (Lourenço et al., 2011; Gasparotto Junior et al., 2009;), their effects on pregnancy had not yet been evaluated.

More recently, studies with the HETM and its primary metabolite Isoquercitrin showed that the hypotensive and antihypertensive effect could be due to inhibition of ACE (Gasparotto Junior et al., 2011a; 2011b). As well described in the literature that ACE inhibitors cause disturbances in the ovarian renin-angiotensin system and can be the cause or the result of such reproductive disorders as polycystic ovary syndrome, ovarian hyperstimulation syndrome, ovarian tumors, and ectopic pregnancy (Yoshimura, 1997; Pena et al., 2010). Additionally, investigations carried out with the use of ACE inhibitors showed that they can cross the placenta easily and may interfere with normal parturition (Mastrobattista, 1997).

In the present work, we observed significant alterations in the variables investigated during critical periods of pregnancy after exposure to different doses of HETM. Firstly, in pre-implantation period were observed significant pre-implant losses and increased levels of estradiol. These data corroborate with described in the literature for classic ACE inhibitors, which can promote ovarian hyperstimulation associated with an elevation plasma estradiol (Speth et al., 1999). Moreover, during pregnancy levels prorenin, renin and chorionic gonadotropin are increased (Yoshimura, 1997). Additionally, ACE inhibitors promote the reduction of hCG levels resulting in an increase in the luteal phase (Peterson et al., 1993; Yoshimura, 1997; Pena et al., 2010).

In fact, there is an important role of Ang II in the reproductive system. Ovarian ACE is membrane-bound in the germinal epithelium, capsule of the corpora lutea and in many, but not all, follicles (Speth et al., 1999). Follicular cells secrete and are affected by Ang II, triggering a diversity of effects that depends on Ang II receptor action. In addition, Ang II receptors AT1 and AT2 have been identified by immunohistochemistry in human (and others species) ovarian follicular cells (Pena et al., 2010). Ang II is involved in oocyte maturation and significantly stimulates the meiotic maturation of ovulated ova and follicular oocytes in the absence of gonadotropin (Yoshimura, 1997). The oocyte maturation involves the participation of Ang II. The use of ACE inhibitors and AT1 receptor blockers can prevent maturation of the oocyte and these are not indicated in women wishing to become pregnant due to reduction of ovulation (Yoshimura, 1997; Pena et al., 2010).

AT1 and AT2 receptors are both in the uterus. During pregnancy, the endometrium undergoes chemical changes that convert it to the decidua (Ganong, 1995). Furthermore, it has been that local actions of Ang II on the uterus may be involved with implantation and control of uterine blood flow during pregnancy (Speth et al., 1999). Thus, our results of pre-implantation losses have shown a reduction in the number of implants, and apparently this reduction resembles the descriptions mentioned in the literature involving the participation of Ang II *in utero*.

In addition, the density of Ang II receptors in the uterus of near-term pregnant women decrease by more than 90%, reflecting more than a 95% loss of AT2 receptors. As might be expected, the contractile actions of Ang II in the human uterus are mediated by AT1 receptors (Matrobattista, 1997; Speth et al., 1999). On the other hand, active agents may be diverse members of the angiotensin peptide family, including angiotensin III and angiotensin (1-7), which may form in the absence of the angiotensin-converting enzyme (ACE) and, therefore, are not affected by the clinically commonly use of ACE inhibitors (Pena et al., 2010). In this sense, aminopeptidase A (APA) is a crucial factor that degrades Ang II into Ang III (Ang 2-8). The cleavage of Ang II into Ang III is also catalyzed by adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER-aminopeptitase 1 (Harata et al., 2006). Moreover, the noncardiovascular tissue

distributions of Ang II degrading enzymes as well as its producing enzymes have not been elucidated, including male and female reproductive systems (Speth et al., 1999; Harata et al., 2006).

In post-implantation period we observed a significant reduction in fetal weight after 20 days of gestation. For the same period evaluated with ACE inhibitors used in medical practice are described a series of adverse effects such as fetal skull abnormalities, intrauterine growth restriction, renal tubular dysplasia, oligohydramnios, pulmonary hypoplasia, respiratory distress syndrome, and fetal and neonatal hypotension (Ganong, 1995; Mastrobattista, 1997; Yoshimura, 1997; Citrin et al., 2011). Here, our data show only a fetal growth restriction, and there were no major changes such as those described previously because probably the *Tropaeolum majus* have different efficacy when compared to other ACE inhibitors, and their additional properties such as antioxidant effect, can produce a reduction of the damage observed on the fetus (Gasparotto Junior et al., 2012).

Although the literature mentions that AT1 receptor antagonists have less adverse effects than the AT2 receptor antagonists in the same period described in relation to fetal growth restriction (Alwan et al., 2005), recent data show that ACE inhibitors and ATR blockers not only promote fetal growth restriction, but also changes renal function, causes spontaneous abortions and increase mortality among fetuses exposed during organogenesis (Moretti et al., 2012). These changes are attributed to the presence of Ang II receptors in the ovary and uterus by a parallel system involves the formation and degradation of bradykinin, a potent vasodilator. Kininases I and II inactivate bradykinin, and kininase II is identical to ACE (Peterson et al., 1993). Bradykinin also increases the conversion of arachidonic acid into prostaglandins, which increases the production of the vasodilating prostaglandins, prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Mastrobattista, 1997). ACE inhibitors were developed to lower blood pressure by interrupting this system (Peterson et al., 1993; Mastrobattista, 1997).

Recently, we demonstrated that *Tropaeolum majus* reduces cell migration in models of acute inflammation (Lourenço et al., 2011). Moreover, Gasparotto

Junior et al. (2009) suggest that the effect of one or more active components of *Tropaeolum majus* partially facilitates the release of renal prostaglandins in male and female rats. However, Lourenço et al. (2012) showed that treatment of pregnancy rats with HETM does not affect the *ex vivo* uterine contractility induced by oxytocin or arachidonic acid. These findings are according to our results because was not observed post - implantation loss or fetal death on day 20 of gestation.

Ang II plays an important role in the growth factors, increases expression of proto-oncogene and their proliferative effects are mediated by receptors type AT1 and AT2 (Schutz et al., 1996). AT2 promotes vascular differentiation and contributes to vasculogenesis and tubular development in the kidney (Mao et al., 2009). Inadvertent use of ACEIs or ARBs during pregnancy causes structural and functional abnormalities in the kidney (Kobori et al., 2007). In addition, a reduction of Ang II can cause low survival rates and diverse congenital renal anomalies, including vascular abnormalities, abnormal glomerulogenesis, renal papillary hyperplasia or atrophy, hydronephrosis and interstitial fibrosis (Kobori et al., 2007; Mao et al., 2009). Several studies have reported that inhibition of RAS may produce specific renal abnormalities including abnormal renal vessels, failure to develop a renal pelvis and tubular atrophy associated with expansion of the interstitium (Schutz et al., 1996; Wolf, 2002; Kobori et al., 2007). In addition, morphological changes observed in the fetal kidney can promote hypotension, which can be a cause of fetal death in birth (Mastrobattista, 1997). In this study we observed significant morphological changes in the kidneys of fetuses exposed to HETM as immature glomeruli, concentric rings, dilated tubules, cystic glomeruli and cystic glomerular tufts. However, our findings showed no death at birth, showing that the adverse effects observed after exposition to *Tropaeolum majus*, are not in the same magnitude of others medicines.

The data from this study clearly demonstrate that exposure to *Tropaeolum majus* during pregnancy can induce risks for the mother and fetus. Thus, we can conclude that the indication of use of this plant during pregnancy should be further investigated, because there are not sufficient data of security assessment for a definitive conclusion.

## Acknowledgements

We are grateful to CAPES-Brazil, CNPq-Brazil and DEGPP/UNIPAR-Brazil for financial support.

## References

- Alwan, S., Polifka, J.E., Friedman, J.M., 2005. Angiotensin II receptor antagonist treatment during pregnancy. *Birth Defects Res A: Clin Mol Teratol* 73,123–130.
- Conover, E.A., 2003. Herbal agents and over-the-counter medications in pregnancy. Best practice & research. *Clinical Endocrinology and Metabolism* 17, 237–251.
- Diav-Citrin, O., Shechtman, S., Halberstadt, Y., Finkel-Pekarsky, V., Wajnberg, R., Arnon, J., Gianantonio, E., Clementi, M., Ornoy, M., 2011. Pregnancy outcome after *in utero* exposure to angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers. *Reproductive Toxicology* 31, 540–545.
- Ferreira, R.B.G., Vieira, M.C., Zárete, N.A.H., 2004. Análise de crescimento de *Tropaeolum majus* 'jewel' em função de espaçamentos entre plantas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 7, 57-66.
- Ferro, D., 2006. *Fitoterapia: conceitos clínicos*. Atheneu, São Paulo.
- Ganong, W.F., 1995. Reproduction and the renin-angiotensin system. *Neurosci Biobehav Rev* 19,241–250.
- Gasparotto Junior, A., Boffo, M.A., Lourenco, E.L., Stefanello, M.E., Kassuya, C.A., Marques, M.C., 2009. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 517-522.
- Gasparotto Junior, A., Gasparotto, F.M., Boffo, M.A., Lourenco, E.L., Stefanello, M.E., Salvador, M.J., da Silva-Santos, J.E., Marques, M.C., Kassuya, C.A., 2011a. Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin-An active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. *J Ethnopharmacol* 134, 210-215.

- Gasparotto Junior, A., Gasparotto, F.M., Lourenco, E.L., Crestani, S., Stefanello, M.E., Salvador, M.J., da Silva-Santos, J.E., Marques, M.C., Kassuya, C.A., 2011b. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *J Ethnopharmacol* 134, 363-372.
- Gasparotto Junior, A., Prando, T.B.L., Leme, T.S.V., Gasparotto, F.M., Lourenço E.L.B., Rattmann, Y.D., Silva-Santos, J.E., Kassuya, C.A.L., Marques M.C.A., 2012. Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. extracts and its main component isoquercitrin. *Journal of Ethnopharmacology* 141, 501– 509.
- Gomes, C., Lourenço, E.L.B., Barbosa, E.L., Duque, A.O., Nihi, F., Lourenço, A.C., Mendes, T.C., Gasparotto Junior, A., Dalsenter, P.R., 2012. Evaluation of subchronic toxicity of the hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 142, 481–87.
- Harata, T., Ando, H., Iwase, A., Nagasaka, T., Mizutani, S., Kikkawa, F., 2006. Localization angiotensin II, the AT1 receptor, angiotensin-converting enzyme, aminopeptidase A, adipocyte-derived leucine aminopeptidase, and vascular endothelial growth factor in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril* 86,433–439.
- Holst, L., Wright, D., Haavik, S., Nordeng, H., 2009. Safety and efficacy of herbal remedies inobstetrics — review and clinical implications. *Midwifery* 27(1), 80-86.
- Kobori, H., Nangaku, M.L., Navar, G., Nishiyama, A., 2007. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. *Pharmacol Rev.* 59(3), 251–287.
- Louik, C., Gardiner, P., Kelley, K., Mitchell, A.A., 2010. Use of herbal treatments in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 202,439.e1-10.

- Lourenço, E.L.B., Muller, J.C., Boareto, A.C., Gomes, C., Lourenço, A.C., Minatovicz, B., Crestani, S., Gasparotto Jr, A., Martino-Andrade, A.J., Dalsenter, P.R., 2012. Screening for in vivo (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of *Tropaeolum majus* L. and its effect on uterine contractility. *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 418-423.
- Lourenço, E.L.B., Prando, T.B.L., Muniz, D., Munhoz, C.J., Dalsenter, P.R., Velasquez, L.G., Gasparotto Junior, A., 2011. Atividade *Tropaeolum majus* L. sobre a mobilização e migração leucocitária em modelo de bolsão inflamatório. *Arquivos de Ciência da Saúde da Unipar* 15,15-9.
- Mao, C., Shi, L., Xu, F., Zhang, L., Xu, Z., 2009. Development of fetal brain renin-angiotensin system and hypertension programmed in fetal origins. *Prog Neurobiol* 87(4) 1-26.
- Mastrobattista, J.M., 1997. Angiotensin converting : Enzyme Inhibitors in Pregnancy. *Semin Perinatal* 21,124-134.
- Moretti, M.E., Caprara, D., Drehuta, I., Yeung, E., Cheung, S., Federico, L., Koren, G., 2012. The Fetal Safety of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Receptor Blockers. *Obstetrics and Gynecology International* 1-6.
- Mustafa, R., Ahmed, S., Gupta, A., Venuto, R.C., 2012. A Comprehensive Review of Hypertension in Pregnancy. *Journal of Pregnancy* 1-19.
- Nordeng, H., Bayne, K., Havnen, C., Paulsen, B.S., 2010. Use of herbal drugs during pregnancy among 600 Norwegian women in relation to concurrent use of conventional drugs and pregnancy outcome. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 1-5.
- Peña, O., Palumbo, A., González-Fernández, R., Hernández, J., Naftolin, F., Ávila, J., 2010. Expression of angiotensin II type 1 (AT1) and angiotensin II type 2 (AT2) receptors in the human granulosa-lutein (GL) cells: correlation with infertility diagnoses. *Fertil Steril* 93,1601-1608.

- Peterson, C.M., Zhu, C., Mukaida, T., Butler, T.A., Woesser, J.F.Jr., LeMaire, W.J., 1993. The angiotensin II antagonist saralasin inhibits ovulation in the perfused rat ovary. *Am. J. Obstet. Gynecol* 168,1242–1245.
- Podymow, T., August P., 2008. Update on the use of antihypertensive drugs in pregnancy. *Hypertension* 51(4), 960–969.
- Schutz, S., Moullec, J.M., Le Corvol, P., Gasc J.M., 1996. Early expression of all the components of the renin–angiotensin system in human development. *Am J Pathol* 149,2067–2079.
- Speth, R.C., Daubert, D.L., Grove, K.L., 1999. Angiotensin II: a reproductive hormone. *Regulatory Peptides* 79,25–40.
- Tabassum, N., Ahmad, F., 2011. Role of natural herbs in the treatment of hypertension 5(9),30-40.
- Wolf, G., 2002. Angiotensin II and tubular development. *Nephrol Dial Transplant* 17 (9),48–51.
- Yoshimura, Y., 1997. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front Neuroendocrinol* 18,247–291.
- Zanetti, G.D., Manfron, M.P., Hoelzel, S.C.S.M., Pagliarin, V.P., Morel, A.F., 2003. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. *Acta Farm. Bonaerense* 22, 159-1.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

Os trabalhos apresentados nesta tese descrevem os efeitos de *Tropaeolum majus* L. em modelos animais para avaliação de atividade (anti) estrogênica e (anti) androgênica e seu efeito sobre a contratilidade uterina seguido da avaliação das alterações observadas durante períodos críticos da gestação.

Diversos trabalhos da literatura descrevem o uso popular de *Tropaeolum majus* em processos inflamatórios, principalmente em casos de asma brônquica (Ferreira, 2004; Ferro, 2006; Lourenço et al., 2011; Rechecho et al., 2011). Plantas medicinais, com potencial antiinflamatório como *Tropaeolum majus* têm sido utilizadas durante a gestação para processos de inflamação e dor (Rechecho et al., 2011) Entretanto, esta atividade antiinflamatória poderia acarretar prejuízos em mulheres grávidas no estágio final da gestação, pois neste período há um aumento nos níveis de estradiol e um declínio nas quantidades de progesterona, que proporcionam em aumento da sensibilidade dos receptores da ocitocina no útero, elevando a produção de prostaglandinas aumentando a contratilidade uterina (Kim, 2007, Müller et al., 2009). Além disso, em modelos de inflamação aguda induzido por carragenina realizados em animais, foi verificada uma redução da migração celular após o tratamento com *Tropaeolum majus* (Sartori et al., 2003, Lourenço et al., 2011).

Outros estudos demonstram a atividade diurética de *Tropaeolum majus* envolvendo a participação de prostaglandinas. Gasparotto Junior et al., 2009, observaram em modelos de diurese realizados em animais, que quando foi utilizada a indometacina, um inibidor clássico da síntese de prostaglandinas, o efeito diurético de *Tropaeolum majus* foi reduzido, sugerindo que a utilização desta planta facilitaria a liberação das prostaglandinas, e que este mediador participa da atividade diurética. Além disso, pesquisas recentes realizadas com as frações de *Tropaeolum majus* e seu composto majoritário isoquercitrina, confirmam os efeitos diuréticos observados com os extratos de *Tropaeolum majus* e ainda descrevem seu efeito hipotensor e antihipertensivo, dependente da inibição da ECA (Gasparotto Junior et al., 2011 a, 2011b).

Neste sentido, nosso primeiro trabalho realizado teve como objetivo investigar a ação de *Tropaeolum majus* em ensaios de desregulação endócrina, pois vários trabalhos na literatura demonstraram que flavonóides como a isoquercitrina podem

ter afinidade a receptores hormonais. Posteriormente, avaliamos seu efeito na contratilidade uterina ao final da gestação com o intuito de verificar a participação das prostaglandinas.

Os resultados aqui obtidos com *Tropaeolum majus* não demonstraram alterações nos tecidos que são sensíveis a ação dos hormônios esteroides sexuais quando foram utilizados os testes com possível ação estrogênica ou antiestrogênica, e de Hershberger com possível ação androgênica ou antiandrogênica. Entretanto, estudos *in vitro* realizados com flavonóides em linhagens de células de câncer de mama hormônio dependentes (MCF-7), na ausência ou presença de estradiol, revelaram respostas estrogênicas e antiestrogênicas, dependente das concentrações testadas de flavonóides (Le Bail et al., 1998). A isoquercitrina, flavonóide majoritário encontrado nas folhas de *Tropaeolum majus*, não produziu uma clara curva dose resposta dependente, mas reduziu a proliferação das células MCF-7 em elevadas concentrações testadas (50µM) quando administrado isoladamente ou na presença de estradiol (Le Bail et al., 1998; Kang et al., 2000; Yang e Liu, 2009).

Em relação aos estudos de contratilidade uterina, os dados demonstraram que o tratamento com *Tropaeolum majus* durante o período gestacional não interferiu com a contratilidade uterina *ex vivo* induzida por ocitocina ou ácido araquidônico. Nossos resultados estão em conformidade com os dados descritos na literatura, pois a isoquercitrina, composto majoritário de *Tropaeolum majus*, possui atividade antiinflamatória em estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, e que este efeito parece estar relacionado com a inibição da via da lipoxigenase. (Fernandez et al., 2005; Rogério et al., 2007). Além disso, inibidores da ECA aumentam a liberação de bradicinina, mediador que converte ácido araquidônico em prostaglandinas, que aumentam a produção de prostaglandinas vasodilatadoras, prostaciclina e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Mastrobattista, 1997).

Embora vários ensaios de atividade farmacológica tenham sido realizados com a planta, existem somente três estudos de toxicologia com *Tropaeolum majus* descritos na literatura, entre estes, dois sobre toxicologia aguda (Zanetti et al., 2003; Gasparotto Junior et al., 2009) e um sobre toxicidade subcrônica (Gomes et al., 2012), que não apresentaram sinais de toxicidade comportamental, alterações nos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos (Gasparotto Junior et al., 2009; Gomes et al., 2012).

Apesar dos resultados de toxicidade apresentarem uma aparente segurança, não há trabalhos na literatura descrevendo os riscos do uso de *Tropaeolum majus* durante o período gestacional. Neste sentido, nós avaliamos a exposição à *Tropaeolum majus in utero* e verificamos consideráveis perdas pré-implantes e aumento dos níveis de estradiol, quando os animais foram expostos aos extratos de *Tropaeolum majus* em três diferentes doses (3, 30 e 300mg/kg).

Recentemente, estudos realizados com os extratos de *Tropaeolum majus* e seu metabólito primordial isoquercitrina, mostraram que o seu efeito hipotensor e antihipertensivo pode ser devido à inibição da ECA (Gasparotto Junior et al., 2011a; 2011b). A literatura descreve que inibidores da ECA causam distúrbios SRA ovariano e esta pode ser a causa de desordens reprodutivas como a síndrome do ovário policístico, síndrome da hiperestimulação ovariana, tumores ovarianos e gravidez ectópica (Yoshimura, 1997; Pena et al., 2010).

A renina é um peptídeo que inicia sua atividade na puberdade e mostra ter uma correlação direta com os níveis plasmáticos de gonadotrofinas (Feitos et al., 2010). A produção de pro-renina e renina em células tecais cultivadas *in vitro* já foi demonstrada, assim como, a expressão do gene pro-renina em células luteais e tecais de macacos e ratos (Speth et al., 1999; Raposo-costa e Reis, 2000).

O ovário de ratas contém quantidades moderadas de pro-renina e renina ativas, mas ambas estão aumentadas durante o período gestacional e elevam os níveis gonadotrofina coriônica (Yoshimura, 1997; Speth et al., 1999). Entretanto, inibidores da ECA podem promover hiperestimulação ovariana associada ao aumento dos níveis plasmáticos de estradiol, redução nos níveis de gonadotrofina coriônica resultando um aumento da fase lútea (Peterson et al., 1993; Yoshimura, 1997; Speth, 1999; Pena et al., 2010).

Outra linha de estudos do SRA tem mostrado a importância da Ang II nos processos de maturação do oócito e ovulação. Estudos experimentais mostram que a adição de gonadotrofina coriônica humana (hCG) produziu aumento da liberação de Ang II em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* (Yoshimura, 1997; Raposo-costa e Reis, 2000; Feitosa et al., 2010; Gonçalves et al., 2012). Estes achados foram confirmados com a administração de um antagonista de Ang II (saralasin) que em ratas impúberes provoca o bloqueio total da ovulação após a sua indução com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e hCG (Feitosa et al., 2010). Além disso, inibidores da ECA como captopril ou antagonistas dos receptores da AT1, como

losartan, reduziram a produção de Ang II e diminuíram a ovulação, mostrando assim o importante papel deste peptídeo na maturação folicular (Yoshimura, 1997; Raposo-costa e Reis, 2000; Feitosa et al., 2010).

Por outro lado, nos últimos anos, foi descrita a participação de outros peptídeos ativos pertencentes à família da Ang II, como Angiotensina III (Ang III) e Angiotensina (1-7) (Ang 1-7) com função na atividade ovariana independente da presença da ECA, e portanto não afetados clinicamente pelos inibidores da ECA (Pena et al., 2010). Ang III e Ang 1-7 são formadas pela presença de aminopeptidase A (APA) que degrada Ang II para Ang III e enzima conversora de ECA 2, que converte Ang I ou Ang II para Ang 1-7 que foram identificadas no desenvolvimento folicular em humanos (Harata et al., 2010; Gonçalves et al., 2012). Além disso, outras enzimas presentes em diversos tecidos estão envolvidas na formação de Ang 1-7 na presença de Ang I ou Ang II. Endopeptidase neutra (NEP) converte Ang I para Ang 1-7. Prolil endopeptidase (PEP) e ECA 2 convertem Ang I ou Ang II em Ang 1-7, embora APA e ECA inativem Ang 1-7 através de sua clivagem em fragmentos menores (Gonçalves et al., 2012).

Em síntese, para esse período de estudos, nossos dados mostram que os extratos de *Tropaeolum majus* podem interferir no SRA ovariano, e que as alterações aqui descritas encontram-se em conformidade com os dados da literatura.

No período pós-implante foram verificadas significativas reduções nos pesos dos fetos tanto em machos quanto em fêmeas nas doses de 30 e 300 mg/kg em machos, e de 300mg/kg em fêmeas ao término da gestação. No mesmo período de avaliação com inibidores da ECA utilizados na clínica médica, são descritos uma série de efeitos adversos como anormalidades fetais do crânio, restrição de crescimento intrauterino, displasia tubular renal, oligoidrânio, hipoplasia pulmonar, hipotensão fetal e neonatal (Ganong, 1995; Mastrobattista, 1997; Yoshimura, 1997; Citrin et al., 2011). Nossos resultados demonstram somente uma restrição do crescimento fetal, e não foram verificadas maiores alterações como as descritas anteriormente porque provavelmente a *Tropaeolum majus* possui uma eficácia diferente quando comparada com outros inibidores da ECA, e propriedades adicionais como efeito antioxidante, podem produzir uma redução nos danos observados nos fetos (Gasparotto Junior et al., 2012).

A Ang II possui um importante papel nos fatores de crescimento, aumento da expressão de proto-oncogenes e estes efeitos proliferativos são mediados por receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (Schutz et al., 1996). Receptores AT<sub>2</sub> promovem diferenciação vascular e contribuem para a vasculogênese e desenvolvimento tubular dos rins (Mao et al., 2009). O uso inadequado de inibidores da ECA ou antagonistas de receptores para Ang II durante a gestação causam anormalidades estruturais e funcionais dos rins (Kobori et al., 2007). Além disso, a redução da Ang II pode causar baixa taxa de sobrevivência e diversas anormalidades renais congênitas, incluindo anormalidades vasculares, anormalidade glomerular, atrofia renal, hidronefrose e fibrose intersticial (Kobori et al., 2007; Mao et al., 2009).

Diversos estudos têm descrito que inibidores da ECA podem produzir anormalidades renais específicas incluindo anormalidades dos vasos renais, incapacidade de desenvolver a pélvis renal e atrofia tubular associada com a expansão do interstício (Schutz et al., 1996; Wolf, 2002; Kobori et al., 2007). Em nossos estudos, foram observadas significativas alterações morfológicas dos rins dos fetos expostos aos extratos de *Tropaeolum majus* como: glomérulos imaturos, anéis concêntricos, túbulos dilatados, cistos glomerulares e tufo glomerulares císticos. Entretanto, nossos resultados não mostraram morte ao nascimento, demonstrando que os efeitos adversos observados com *Tropaeolum majus* não se encontram na mesma magnitude dos efeitos descritos na literatura. Porém, os achados morfológicos encontrados nos rins indicam a necessidade de subseqüentes estudos neste período crítico de desenvolvimento.

## 7. Conclusões

Concluimos que os extratos de *Tropaeolum majus* não possuem atividade nos tecidos que são sensíveis a ação dos hormônios esteroides sexuais e também não promovem interferência na contratilidade uterina ao término da gestação. Entretanto, a exposição à *Tropaeolum majus* acarreta riscos a mãe e ao feto durante todo o período gestacional verificada em períodos distintos através da redução do número de implantes e aumento dos níveis plasmáticos de estradiol nas progenitoras (período pré-implantação); restrição do crescimento fetal e alterações morfológicas nos rins dos fetos (período pós-implantação), em todas as doses utilizadas.

Os dados aqui apresentados suportam a hipótese de que a *Tropaeolum majus* apresenta grande potencial toxicológico, entretanto necessita de profunda avaliação de segurança no caso de sua indicação terapêutica incidir sobre o período gestacional.

## 8. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Portaria Nº 116/MS/SNVS, de 8 de agosto de 1996. Publica proposta de Norma para estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos (anexos I e II). Diário Oficial da União; Poder Executivo, publicado no dia 12 de agosto de 1996. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 16 jul. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC Nº 17, de 25 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasil, 2000. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17\\_00rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc.htm)>. Acesso em: 16 jul. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução-RDC Nº 48, de 16 de março de 2004, (2004a). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, publicado no dia 18 de março de 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 16 jul. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE Nº 90, de 16 de março de 2004, (2004b). Determina a publicação do "Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos". Diário Oficial da União; Poder Executivo, publicado no dia 18 de março de 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 16 jul. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução Nº 4 de 10 de fevereiro de 2009. Dispõe sobre as normas de farmacovigilância para os detentores de registro de medicamentos de uso humano. Diário Oficial da União.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasil, 2010a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16 jul. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasil,2010b.Disponívelem:<[http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg\\_norma\\_espeelho\\_consulta.cfm](http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_espeelho_consulta.cfm). Acesso em: 16 jul.2012.

Albuquerque UP, Hanazaki N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Braslian.Journal Pharmacognosy* 2006;16:678-89.

Allaire AD, Moos MK, Wells SR. Complementary and alternative medicine in pregnancy: a survey of North Carolina certified nurse-midwives. *Obstet Gynecol* 2000;95:19-23.

Al-Qura'N S. Ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan. *Toxicon* 2005;46:119-29.

Alwan S, Polifka JE, Friedman JM. Angiotensin II receptor antagonist treatment during pregnancy. *Birth Defects Res A: Clin Mol Teratol* 2005;73:123–30.

Antunes-Rodrigues J, Favaretto ALV. Sistema reprodutor. In: Mello Aires, M. de. *Fisiologia*. Guanabara Koogan (Rio de Janeiro) 1999;877-917.

Araujo RC. Estudo toxicológico das drogas. Correlação clinicopatologia. in: SILVA,P. *Farmacologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1998;20:131-50.

Aschwanden C. Herbs for health, but how safe are they? *Bull. W. H. O.*, Geneva 2001;79(7):691-2.

Baker VA. Endocrine disrupter testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in vitro* 2001;15:413-9.

Balbino EE, Dias MF. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn* 2010;20(6).

Barata L. Empirismo e ciência: fonte de novos fito medicamentos. Cien. Cultura 2005;57:4-5.

Binet L. A biologist physician in the country. Biol. Med 1964;53: 5–28.

Boareto AC, Muller JC, Bufalo AC, Botelho GGK, Araujo SL, Foglio MA, Morais RN, Dalsenter PR. Toxicity of artemisinin [*Artemisia annua* L.] in two different periods of pregnancy in Wistar rats. Reproductive Toxicology 2008;25:239–46.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde 2006. 60p.

Breinholt V, Hossaini A , Svendsen GW, Brouwer C, Nielsen S.E. Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of estrogen receptor distribution, metabolism and bioavailability. Food and Chemical Toxicology 2000;38:555-64.

Brum L. Utilização de medicamentos por gestantes usuárias do Sistema Único de Saúde no município de Santa Rosa (RS, Brasil). Ciência & Saúde Coletiva. Canoas RS 2011;(16):2442-2435.

Buttar HS, Jones KL. What do we know about the reproductive and developmental risks of herbal and alternate remedies? Birth Defects Research (part B) 2003;68: 492-3.

Capasso R, Izzo AA, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, Mascolo N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. Fitoterapia 2000;71:58-65.

Cárdenas-Valencia, Nieto J, Gasco M, Gonzales C, Rubio J, J. Portella G, Gonzales F. *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) reduces testicular function: effect of different treatment times. First International Journal of Andrology 2008;40:352-7.

Chechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 1998;21(1):99-103.

Citrin-Diav O, Shechtman S, Halberstadt Y, Finkel-Pekarsky V, Wajnberg R, Arnon J, Gianantonio E, Clementi M, Ornoy A. Pregnancy outcome after *in utero* exposure to angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers. *Reproductive Toxicology* 2011;31:540–45.

Colborn T. Neurodevelopment and endocrine disruption. *Environ Health Perspect* 2004;112:944-9.

Cooper WO, Hernandez-Diaz S, Arbogast PG, Dudley JA, Dyer S, Gideon PS Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *The New England Journal of Medicine* 2006;354(23):2443–51.

Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional (Rio de Janeiro) 1978;2:67.

Dalsenter PR, Faql AS, Weeb J, Merker HJ, Chahoud I. Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation. *Human & Experimental Toxicology* 1997;16:146-53.

De Medeiros JMR, Macedo M, Contancia JP, Nguyen C, Cunningham G, Miles DH. Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 72:157-65.

De Smet P. Health risks of herbal remedies: an update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2004;76:1–17.

Destro MWB, Speranzini MB, Destro C, Guerra C, Recco GC, Romagnolo LGC. Estudo da utilização no pré-operatório de medicamentos ou drogas fitoterápicas que alteram a coagulação sanguínea. *Revista Colégio Brasileiro Cirurgia* 2006;33(2):107-11.

Elbetieha A, Al-Hamooda MH, Alkofahic A, Batainehd H. Reproductive toxicity potentials of *Salvia fruticosa* (L) in rats. *J Ethnopharmacol* 1998;61:67-74.

Feitosa LCS, Viana GEN, Reis AM, Costa APR. Sistema renina-angiotensina ovariano. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte* 2010;34(4):243-51.

Fernandez J, Reyes R, Ponce H, Oropeza M, VanCalsteren M, Jankowski C, Campos MG. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. *European Journal of Pharmacology* 2005; 522:108–15.

Ferreira RBG, Vieira MC, Zárete NAH. Análise de crescimento de *Tropaeolum majus* 'jewel' em função de espaçamentos entre plantas. *Revista Brasileira Plantas Medicas* 2004;7(1):57-66.

Ferro, D. *Fitoterapia: conceitos clínicos*. Atheneu, São Paulo 2006.

Florencio V, Junior V. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2008;18(2):308-13.

França ISX, Souza JA, Baptista RS, Britto VRS. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista Brasileira Enfermagem* 2008;61(2):201-8.

Francischi JN. *A farmacologia em nossa vida*. Editora UFMG (Belo Horizonte) 2005;1:137.

Gadano AB, Gurni AA, Carballo MA. Argentine folk medicine: Genotoxic effects of *Chenopodiaceae* family. *Journal of Ethnopharmacology* 2006;103:246–51.

Ganong WF. Reproduction and the renin-angiotensin system. *Neurosci Biobehav Rev* 1995;19:241–50.

Garzón ZA, Wrolstad RE. Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*). *Food Chemistry* 2009;114:44-9.

Gasparotto Junior A, Boffo MA, Lourenço ELB, Stefanello MEA, Kassuya CAL, Marques MCA. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 122:517-22.

Gasparotto Junior A, Gasparotto FM, Boffo MA, Lourenco EL, Stefanello, ME, Salvador MJ, da Silva-Santos JE, Marques MC, Kassuya CA. Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin-An active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. *J Ethnopharmacol* 2011a;34: 210-5.

Gasparotto Junior A, Gasparotto FM, Lourenco EL, Crestani S, Stefanello ME, Salvador MJ, da Silva-Santos JE, Marques MC, Kassuya CA. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *J Ethnopharmacol* 2011b;134: 363-72.

Gasparotto Junior A, Prando TBL, Leme TSV, Gasparotto FM, Lourenço ELB, Rattmann YD, Silva-Santos JE, Kassuya CAL, Marques MCA. Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. extracts and its main component isoquercitrin. *Journal of Ethnopharmacology* 2012;141:501–09.

Gomes C, Lourenço ELB, Barbosa EL, Duque AO, Nihi F, Lourenço AC, Mendes TC, Gasparotto Junior A, Dalsenter PR. Evaluation of subchronic toxicity of the hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2012; 142: 481–7.

Gonçalves PB, Bernardo RF, Oliveira JF, Gasperin B. Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances. *Reproduction* 2012;143:11–20

Gonzales J, Benavides V, Rojas R, Pino J. Embryotoxic and teratogenic effect of *Ruta chalepensis* L. «rue», in mouse (*Mus musculus*). Rev. peru. biol. número especial 2007;13(3): 223 – 25.

Gray LE. Xenoendocrine disrupters: laboratory studies on male reproductive effects. Toxicology Letters 1998;102-103:331-5.

Griffiths DW, Deighton N, Birch ANE, Patrian B, Baur R, Stadler E. Identification of glucosinolates on the leaf surface of plants from the Cruciferae and other closely related species. Phytochemistry 2001;57: 693–700.

Gupta D, Bleakley B, Gupta RK. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. Journal of Ethnopharmacology 2008;115:361–80.

Harata T, Ando H, Iwase A, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F. Localization of angiotensin II, the AT1 receptor, angiotensin-converting enzyme, aminopeptidase A, adipocyte-derived leucine aminopeptidase, and vascular endothelial growth factor in the human ovary throughout the menstrual cycle. Fertil Steril 2006;86:433–9.

Hiremath SP, Badami S, Swamy HKS, Patil SB, Londonkar RL. Antiandrogenic effect of *Striga orobanchioides*. J. Ethnopharmacol 1997;56:55-60.

Howell L, Kochhar K, Saywell RJr, Zollinger T, Koehler J, Mandzuk C, Sutton B, Sevilla-Martir J, Allen D. Use of Herbal Remedies by Hispanic Patients: Do They Inform Their Physician? Journal of the American Board of Family Medicine 2006;19(6) 566–78.

Jurgens TM. Potential toxicities of herbal therapies in the developing fetus. Birth Defects Research (part B) 2003;68:496-8.

Kang KS, Kim HS, Ryu DY, Che JH, Lee YS. Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized uterotrophic assay for the detection of estrogenicity of p-nonylphenol in Sprague-Dawley rats. Toxicol Lett 2000;118:109-15.

Kim HG, Yoon DH, Lee WH, Han SK, Shrestha B, Kim CH, Lim MH, Chang W, Lim S, Chol S, Song WO, Sung JM, Hwang KC, Kim TW. Phellinus linteus inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF- $\kappa$ B and MAPK $\delta$  activation in lipopolysaccharide – induced RAW 264.7 macrophage. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;114:307–15.

Kjaer A, Madsen JO, Maeda Y. Seed volatiles within the family Tropaeolaceae. *Phytochemistry* 1978;17:1285-7.

Kobori H, Katsurada A, Ozawa Y, Satou R, Miyata K, Hase N, Suzaki Y, Shoji T. Enhanced intra-renal oxidative stress and angiotensinogen in IgA nephropathy patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358:156–63.

Lacroix I, Damase-Michel C, Lapeyre-Mestre M, Montastruc JL. Prescription of drugs during pregnancy in France. *Lancet* 2000;356:1735-76.

Le Bail JC, Varnat F, Nicolas JC, Habrioux G. Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. *Cancer Letters* 1998;130:209-16.

Liang Y, Xie P, Chan K. Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr* 2004;812:53-70.

Lima LRP, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Stringheta PC. Bixin, Norbixin and Quercetin and lipid metabolism effects in rabbits. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2001;38(4):196-200.

Ling S, Nheu L, Dai A, Guo Z, Komesaroff P. Effects of four medicinal herbs on human vascular endothelial cells in culture. *International Journal of Cardiology* 2008;128:350–58.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum (São Paulo) 2002:129-473.

Lourenço ELB, Muller JC, Boareto AC, Gomes C, Lourenço AC, Minatovicz B, Crestani S, Gasparotto Jr A, Martino-Andrade AJ, Dalsenter PR. Screening for in vivo (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of *Tropaeolum majus* L. and its effect on uterine contractility. *Journal of Ethnopharmacology* 2012;141:418-23.

Lourenço ELB, Prando TBL, Muniz D, Munhoz CJ, Dalsenter PR, Velasquez LG, Gasparotto Junior A. Atividade *Tropaeolum majus* L. sobre a mobilização e migração leucocitária em modelo de bolsão inflamatório. *Arquivos de Ciência da Saúde da Unipar* 2011;15:15-9.

Lykkesfeldt J, Meller BL. Synthesis of Benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L. *Plant Physiology* 1993;102:609-13.

Macena LM, Nascimento ASS, Krambeck K, Silva FA. Plantas medicinais utilizadas por gestantes atendidas na unidade de saúde da família (usf) do bairro Cohab Tarumã no município de Tangará da Serra, Mato Grosso. *Rev. Biologia e Farmácia (Biofar)* 2012;07(1).

Maciel MAM. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 2002;25(3):429-38.

Mao C, Shi L, Xu F, Zhang L, Xu Z. Development of fetal brain renin–angiotensin system and hypertension programmed in fetal origins. *Prog Neurobiol* 2009;87(4):1-26.

Marles RJ, Jordan SA, Cunningham DG. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010;243:198–16.

Marques NFQ, Marques APBM, Iwano AL, Golin M, De-Carvalho RR, Paumgarten FJR, Dalsenter PR. Delayed ossification in Wistar rats induced by *Morinda citrifolia* L. exposure during pregnancy. *Journal of Ethnopharmacology* 2010;128:85–91.

Mastrobattista JM. Angiotensin converting : Enzyme Inhibitors in Pregancy. *Semin Perinatal* 1997;21:124-34.

Mengue SS, Schenkelb EP, Duncan BB, Schmidt MI. Uso de medicamentos por gestantes em seis cidades brasileiras. *Rev Saude Publ* 2001;35:415-20.

Mietkiewska E, Giblin EM, Wang S, Barton DL, Dirpaul J, Brost JM, Katavic V, Taylor DC. Seed-Specific Heterologous Expression of a *Nasturtium FAE* Gene in *Arabidopsis* Results in a Dramatic Increase in the Proportion of Erucic Acid. *Plant Physiology* 2004;136(1):2665–75.

Moreira LMA, Dias AL, Silva RHB, Falcão CL, Tony DFTD, Stringuetti C, Santos MDF. Associação entre o Uso de Abortifacientes e Defeitos Congênitos. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetícia* 2001; 23(8):517-21.

Moretti ME, Caprara D, Drehuta I, Yeung E, Cheung S, Federico L, Koren G. The Fetal Safety of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Receptor Blockers. *Obstetrics and Gynecology International* 2011; 1-6 .

Muller JC, Botelho GGK, Búfalo A, Boreto AC, Rattmann YD, Martins ES, Cabrini DA, Otuki MF, Dalsenter PR. *Morinda citrifolia* Linn (Noni): in vivo and in vitro reproductive toxicology. *Journal of Ethnopharmacology* 2009;121:229–33.

Nicoletti MA. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. *Infarma* 2007;19(1):32-50.

Norman JE, Bollapragada S, Yuan M, Nelson SM. Inflammatory pathways in the mechanism of parturition. *BMC Pregnancy and Childhood* 2007;7(1):1-4.

Nunes MMH, Paiva JA, Ramos AT, Maiorka PC, Mayumi MV. Effects of *Buchenaria tomentosa* consumption on female rats and their offspring. *Maringá* 2010;32(4):423-29.

Pastusazk AL. Misoprostol use during pregnancy is associated with increased risk for Mobius sequence in: meeting of the teratology society, Londres. *Teratology - The Journal of Abnormal Development*. New York : Wiley-Liss, 1997:p.36.

Peña O, Palumbo A, González-Fernández R, Hernández J, Naftolin F, Ávila J. Expression of angiotensin II type 1 (AT1) and angiotensin II type 2 (AT2) receptors in the human granulosa-lutein (GL) cells: correlation with infertility diagnoses. *Fertil Steril* 2010;93:1601-8.

Peterson CM, Zhu C, Mukaida T, Butler TA, Woesser JF Jr, LeMaire WJ. The angiotensin II antagonist saralasin inhibits ovulation in the perfused rat ovary. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1993;168:1242-45.

Phillipson JD. A matter of some sensitivity. *Phytochemistry* 1995;3:1319-43.

Picciarelli P, Alpi A, Pistelli L, Scalet M. Gibberellin-like activity in suspensors of *Tropaeolum majus* L. and *Cytisus laburnum* L. *Planta* 1984;162(6):566-8.

Picciarelli P, Alpi A. Embryo-suspensor of *Tropaeolum majus*: Identification of gibberellin A<sub>63</sub>. *Phytochemistry* 1987;26(2):329-30.

Pilla MAC, Amorozo MCM, Furlan A. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. *Acta botânica brasileira* 2006;20(4):789-802.

Pintão AM, Pais MS, Coley H, Kelland LR, Judson IR. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of benzyl isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*. *Planta Medicine* 1995;61(3):233-6.

Pivoto FL, Buzatti A, Krawczak FS, Camillo G, Sangioni LA, Zanetti GD, Manfron MP, Vogel FSF. Ação acaricida in vitro de *Tropaeolum majus* sob teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ciência Rural* 2010;40(10).

Podymow T, August P. Update on the use of antihypertensive drugs in pregnancy. *Hypertension* 2008;51(4): 960-9.

Rangel M, Bragança FCR. Representações de gestantes sobre o uso de plantas medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu* 2009;11(1):100-09.

Raposo-Costa AP, Reis AM. O sistema renina-angiotensina em ovário. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2000;44:306-13.

Rechecho S, Uriarte-Pueyo I, Calvo J, Vivas LA, Calvo MI. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a parto of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas. Peru. *Journal of Ethnopharmacology* 2011;133:75-85.

Reis MS, Mariot A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC 2001; 41-62.

Ribeiro WS, Barbosa JÁ, Costa IC, Bruno RLA, Almeida EIB, Silva KRG, Braga Júnior JM, Bezerra AKD. Conservação e fisiologia pós-colheita de folhas de Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) *Rev. Bras. Pl. Med., BotucatU* 2011;13:598-605.

Rodrigues HG, Meireles CG, Lima JTS, Toledo GP, Cardoso JL, Gomes SL. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu* 2011;13(3)359-66.

Roehsig M, Sant'Anna SG, Salles KRRD, Santos MF, Yonamine M. Abortifacientes: efeitos tóxicos e riscos. *Saúde, Ética & Justiça* 2011;16(1):1-8.

Rogério AP, Kanashiro A, Fontanari CSEV, Lucisano-Valim YM, Soares EG. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercetrin in experimental murine allergic asthma. *Inflamm Res* 2007;56:402–8.

Sangalli A, Vieira MC, Zárata NAH. Resíduos orgânicos e nitrogênio na produção de biomassa da capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) 'jewel'. *Horticultura brasileira* 2004;28(4):831-9.

Santo APE, Martins ISS, Tomy SC, Ferro VO. Efeito anticoagulante in vitro do extrato hidroetanólico de folhas e flores édulas de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) sobre o plasma humano. *Latin American Journal of Pharmacy* 2007;26:732–6.

Santos RL, Guimarães GP, Nobre MSC, Portela AS. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu* 2011;13(4):486-91.

Sartori LR, Ferreira MS, Perazzo FF, Mandalho LL, Carvalho JCT. Atividade antiinflamatória do granulado de *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L. *Rev. Bras. Farmacognosia* 2003;13:17-19.

Schutz S, Moullec JM, Le Corvol P, Gasc JM. Early expression of all the components of the renin–angiotensin system in human development. *Am J Pathol* 1996;149:2067–79.

Scialli AR. The challenge of reproductive and developmental toxicology under Reach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2008;51: 244–50.

Sharpe RM. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicology Letters* 2001;120:221-32.

Sharpe RM. The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now? *International Journal of Andrology* 2003;26:2-15.

Shimada H, Uchida M, Okawara T, AbeS, Imamura Y. Inhibitory effects of flavonoids on the reduction of progesterone to 20 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in rat liver. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2005;93;73–9.

Silva MEPF, Mussury RM, Vieira MC, Alves Júnior VV, Pereira ZV, Scalon SPQ. Floral biology of *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) and its relation with *Astylus variegatus* activity (Germar 1824) (Coleoptera: Melyridae). *An Acad Bras Cienc* 2011; 83(4): 1251-58

Simoni CL. Fitoterapia - linha do tempo. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/profissional>>. Acesso em: 10 de out. 2011.

Skakkebaek NE, Rajpert-de Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* 2001;16:972-8.

Souza-Moreira TM, Salgado HRN, Pietro RCLR. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2008;20(3):435-40.

Speth R.C, Daubert DL, GroveKL. Angiotensin II: a reproductive hormone. *Regulatory Peptides* 1999;79:25–40.

Springfield EP, Eagles PKF, Scott G. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. *J. Ethnopharmacol* 2005;101:75-83.

Tilson HA. Developmental neurotoxicology of endocrine disruptors and pesticides: identification of information gaps and research needs. *Environ Health Perspect* 1998;106: 807-11.

Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2006;42(2):289–306.

Vaz APA, Jorge MHA, Capuchinha. In: EMBRAPA (Ed.). *Plantas Medicinais Codimentares e Aromáticas*. Corumbá: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

Veiga Junior V, Pinto A, Maciel MA. Plantas medicinais: cura segura? *Quim. Nova* 2005;28:519-28.

Wielanek M, Urbanek H. Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2006;86:177–86.

Wolf G. Angiotensin II and tubular development. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(9):48–51.

World Health Organization (WHO). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. WHO/PCS/EDC/02.2. pp. 180. WHO., Geneve, 2002.

World Health Organization (WHO) Fact sheet n° 134: Traditional medicine. 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/index.html>>. Acesso em: 10/06/2012.

Wu KM, Ghantous H, Birnkrant DB. Current regulatory toxicology perspectives on the development of herbal medicines to prescription drug products in the United States. *Food and Chemical Toxicology* 2008;46:2606–10.

Xu S, Levine M. Medical residents' and students' attitudes towards herbal medicines: a pilot study. *Canadian Society for Clinical Pharmacology* 2008;15(1):1-4.

Yao M, Ritchie HE, Brown-Woodman PD. A reproductive screening test of hawthorn. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;118:127-32.

Yang J, Liu RH. Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-beta-d-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009;57:8581-86.

Yoshimura Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front Neuroendocrinol* 1997;18:247–91.

Zanetti GD, Manfron MP, Hoelzel SCSM, Pagliarin VP, Morel AF. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. *Acta Farm. Bonaerense* 2003; 22:159-62.

Zanetti GD, Manfron MP, Hoelzel SCS. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). Iheringia 2004;59(2):173-8.

Zeichen de Sa R, ReyA, Argañaraz E, Bindstein E. 2000. Perinatal toxicology of *Ruta chalepensis* (*Rutaceae*) in mice. J. Ethnopharmacol 2000;69:93–98.

## ANEXOS

Journal of Ethnopharmacology 134 (2011) 363–372



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme

Arquimedes Gasparotto Junior<sup>a,b,\*</sup>, Francielly Mourão Gasparotto<sup>a</sup>, Emerson Luiz Botelho Lourenço<sup>a,b</sup>, Sandra Crestani<sup>b</sup>, Maria Elida Alves Stefanello<sup>c</sup>, Marcos José Salvador<sup>d</sup>, José Eduardo da Silva-Santos<sup>e</sup>, Maria Consuelo Andrade Marques<sup>b</sup>, Cândida Aparecida Leite Kassuya<sup>b,f</sup>

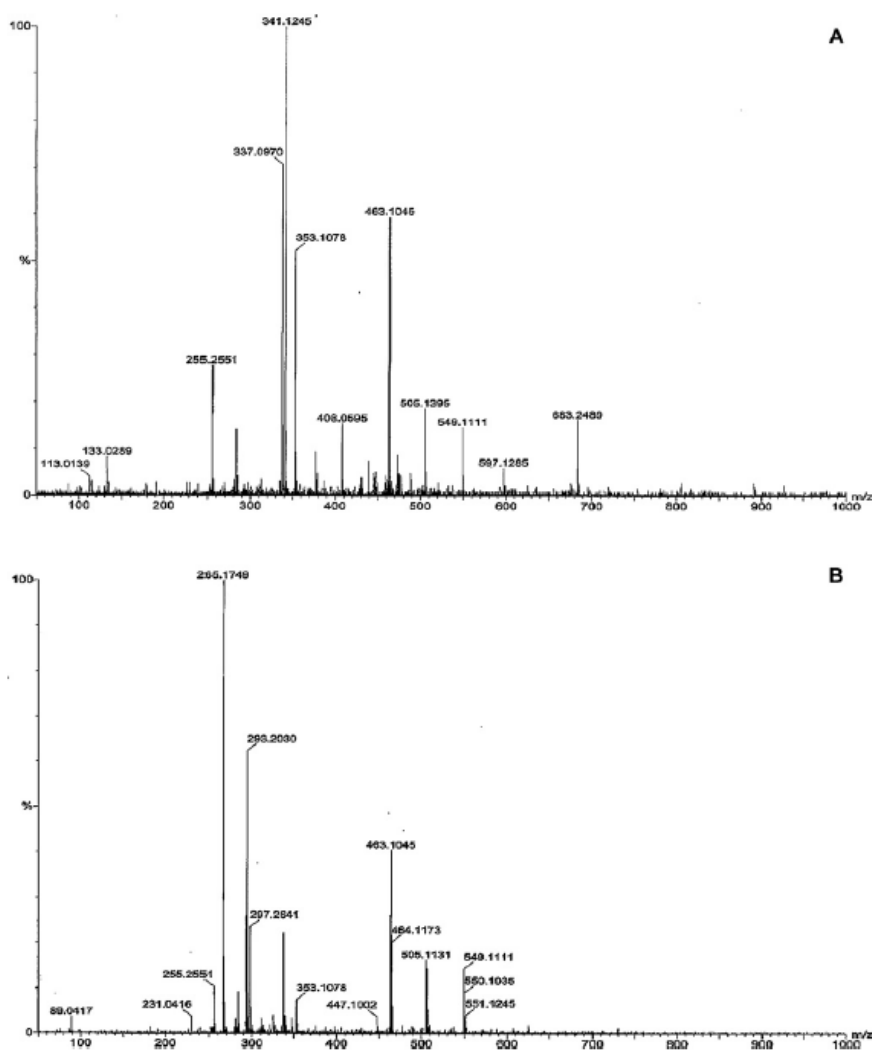


Fig. 1. ESI(-)-MS fingerprints of HETM (A) and TMLR (B).

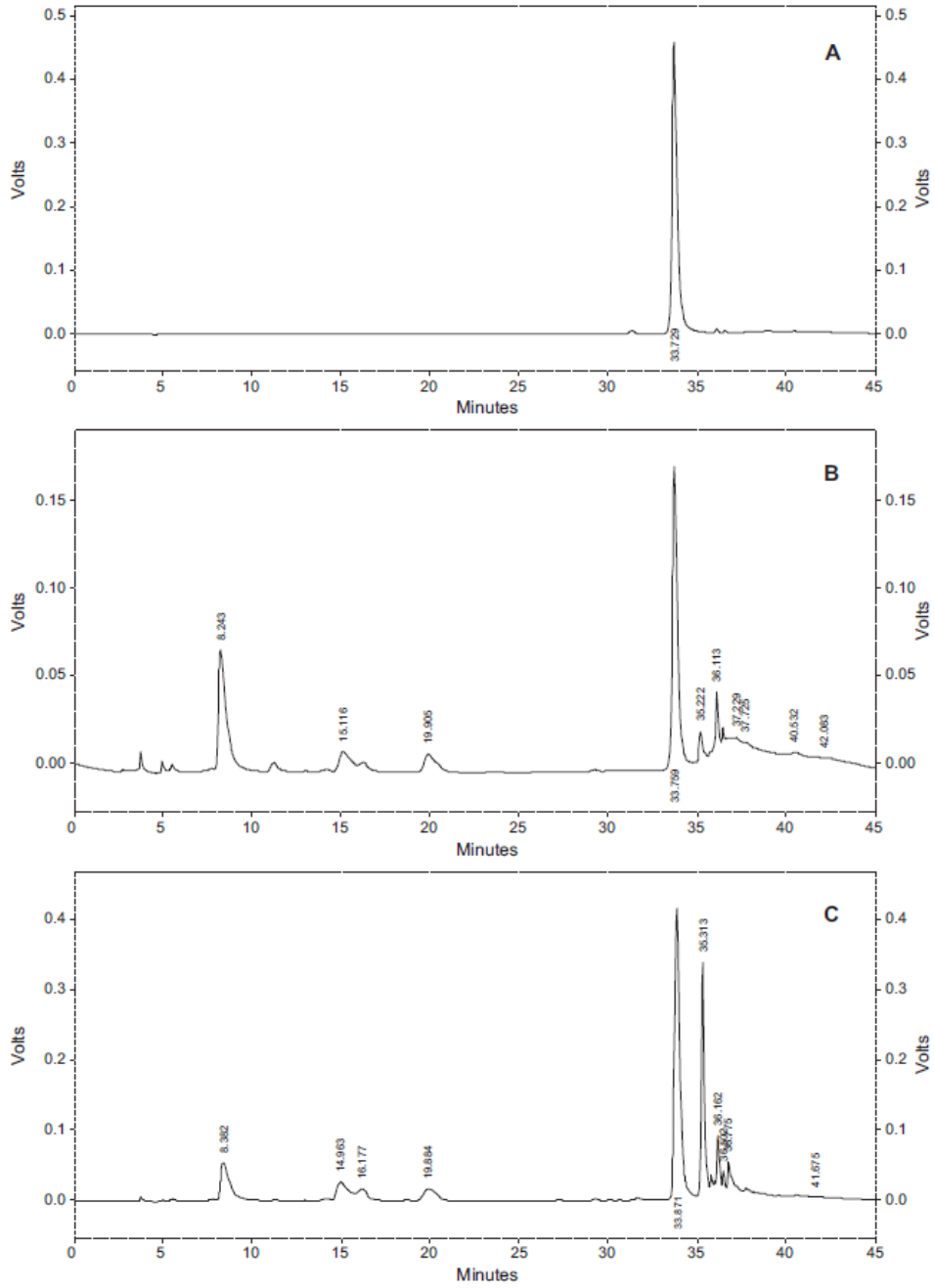


Fig. 2. HPLC chromatograms of isoquercitrin (A), HETM (B) and TMLR (C).

**Table 1**  
Isoquercitrin content of HETM and TMLR from *Tropeaeolum majus*.

| Sample | Isoquercitrin content <sup>a</sup> |
|--------|------------------------------------|
| HETM   | 38.64 (0.30)                       |
| TMLR   | 93.45 (2.80)                       |

<sup>a</sup> Isoquercitrin content (mean of triplicate analysis), expressed as mg/g of dried extract or fraction (% RSD, relative standard deviation).