

SHEYLA NOYA FRACARO

POTENCIAL DE TOXICIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO DE *Tillandsia usneoides* Linnaeus, 1762 (BARBA-DE-PAU) EM COELHAS GESTANTES

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre, Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Deconto.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tomoe Nakashima

CURITIBA

2004

Nada que se diga neste momento poderia demonstrar a importância de uma vida. Nem tudo que se faça ou se escreva pode chegar aos pés de se demonstrar a importância de um exemplo, ainda mais quando ele é deixado assim, tão patente.

À dr^a. Sonia M. H. Fracaro, *in memoriam*. Pela meta... também.

Este trabalho é dedicado à minha família, que me apoiou, estimulou e deu forças em todos os momentos; e ao Amarildo, paciente e solícito, base constante da minha realidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ivan Deconto e à Prof^a Tomoe Nakashima, pela paciência e orientação;
Ao Prof. José Ricardo Pachaly, da UNIPAR; ao Prof. Otávio Guimarães, do setor de Botânica da UFPR; ao Prof. Carlos André D. Fernandes, da UTP; ao Prof. João Carlos Possamay, do setor de Fitotecnia da UFPR; e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, pela vida.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	v
	LISTA DE FIGURAS	vi
	RESUMO	vii
	ABSTRACT	viii
1	INTRODUÇÃO	01
1.1	OBJETIVO	03
1.2	OBJETIVO GERAL	03
1.3	OBJETIVO ESPECÍFICO	03
1.4	JUSTIFICATIVA	03
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1	ASPECTOS BOTÂNICOS	04
2.1.1	Distribuição Geográfica.....	06
2.1.2	Nomes Vulgares.....	06
2.1.3	Sinonímia Botânica.....	07
2.2	ASPECTOS FITOQUÍMICOS	07
2.3	ASPECTOS ETNOFARMACOLÓGICOS	08
2.4	ASPECTOS FARMACOLÓGICOS	08
2.5	ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	11
2.5.1	Seleção.....	11
2.5.2	Preparo dos Extratos.....	12
2.5.3	Critérios e Cuidados para Escolha de Testes Biológicos.....	12
2.5.4	A Interação entre a Farmacologia e a Química para o Isolamento do Princípio Ativo.....	13
2.5.5	Principais Classes de Produtos Naturais.....	14
2.5.5.1	Alcalóides.....	17
2.5.5.2	Cumarinas.....	18
2.5.5.2.1	Micotoxinas.....	19
2.5.5.3	Flavonóides.....	20
2.5.5.4	Derivados antociânicos.....	21
2.5.5.5	Taninos.....	22
2.5.5.6	Glicosídeos antraquinônicos.....	22
2.5.5.7	Terpenos e esteróis.....	23
2.5.5.8	Saponinas.....	25
2.5.5.9	Heterosídeos cianogenéticos.....	26
2.6	COELHOS.....	26
2.6.1	Alimentação.....	26
2.6.2	Coprofagia e Cecotropia.....	28
2.6.3.1	Anatomia do sistema reprodutor.....	30
2.6.3.2	Função ovárica e ovulação.....	30

2.6.3.3	Ciclo estral e cio.....	31
2.6.3.4	Acasalamento.....	31
2.6.3.5	Sinais de fecundação.....	32
2.6.3.6	Gestação.....	33
2.6.3.7	Pseudogestação.....	34
2.6.3.8	Período pós implantação.....	34
2.6.3.9	Período fetal.....	37
2.6.3.10	Parto.....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	38
3.2	ENSAIOS FITOQUÍMICOS.....	38
3.2.1	Preparo do Extrato Hidroalcoólico a 20%.....	38
3.2.2	Análises Organolépticas e Determinação de pH.....	39
3.2.3	Determinação do Extrato Seco.....	39
3.2.4	Pesquisa de Alcalóides.....	40
3.2.5	Pesquisa de Glicosídeos Flavônicos	40
3.2.5.1	Reação oxalo-bórica.....	40
3.2.6	Pesquisa de Esteróides ou Triterpenos.....	40
3.2.7	Pesquisa de Glicosídeos Antraquinônicos.....	41
3.2.8	Pesquisa de Cumarinas.....	41
3.2.8.1	Pesquisa de micotoxinas.....	42
3.2.9	Pesquisa de Aminogrupos.....	42
3.2.10	Preparo do Extrato Aquoso.....	42
3.2.11	Análises Organolépticas e Determinação de pH.....	42
3.2.12	Determinação do Extrato Seco.....	43
3.2.13	Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos.....	43
3.2.14	Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos.....	43
3.2.15	Pesquisa de Heterosídeos Cianogênicos.....	43
3.2.16	Reação de Schoembein.....	44
3.2.17	Pesquisa de Aminogrupos.....	44
3.2.18	Pesquisa de Ácidos Fixos.....	44
3.2.19	Pesquisa de Taninos.....	45
3.2.19.1	Reações com sais de ferro III.....	45
3.2.19.2	Reação de formol.....	45
3.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DE <i>Tillandsia usneoides</i> PARA PREPARO DO LIOFILIZADO.....	45
3.3.1	Equipamentos.....	45
3.3.2	Obtenção do Extrato Hidroalcoólico para o Tratamento.....	46
3.3.3	Animais e Manutenção.....	46
3.3.4	Acasalamento e Gestação.....	47
3.3.5	Grupos Experimentais e tratamento.....	47
3.3.6	Escolha das Doses de Tratamento.....	47
3.3.7	Parâmetros a Serem Avaliados.....	47
4	RESULTADOS	49
5	DISCUSSÃO	52

6	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ANÁLISE DE PRINCÍPIOS ATIVOS PRESENTES EM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Tillandsia usneoides</i>	49
TABELA 2: ANÁLISE DE PRINCÍPIOS ATIVOS PRESENTES EM EXTRATO AQUOSO DE <i>Tillandsia usneoides</i>	50
TABELA 3: NÚMERO DE FILHOTES VIVOS E NATIMORTOS OBTIDOS DE COELHAS TRATADAS COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO LIOFILIZADO DE <i>Tillandsia usneoides</i>	50
TABELA 4: TAXAS REPRODUTIVAS OBSERVADAS EM COELHAS TRATADAS COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO LIOFILIZADO DE <i>Tillandsia usneoides</i>	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: PRINCIPAIS VIAS METABÓLICAS DO METABOLISMO VEGETAL SECUNDÁRIO.....	15
FIGURA 2: DISTRIBUIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS ATIVAS DE ESPÉCIES LENHOSAS, NAS CLASSES QUÍMICAS DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS.....	16
FIGURA 3: FLUXOGRAMA DE PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DE <i>Tillandsia usneoides</i>	38

RESUMO

Tillandsia usneoides, também conhecida como barba-de pau ou barba-de-velho, é uma bromeliácea presente em grande parte do território brasileiro, e em áreas úmidas desde o sudoeste dos EUA até o centro da Argentina e Chile. Relatos de criadores de animais relacionam essa planta à ocorrência de abortos em éguas e vacas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de toxicidade reprodutiva do extrato hidroalcoólico de *Tillandsia usneoides* em coelhas expostas durante a gestação, além de análise fitoquímica de partes totais dessa planta. Em análise fitoquímica observou-se a presença de flavonóides, esteróides, antraquinonas, cumarinas, micotoxinas, antocianinas, saponinas, ácidos fixos, taninos e aminogrupos. Em experimento com o extrato hidroalcoólico liofilizado dado a coelhas gestantes os resultados foram inconclusivos devido a ocorrência da pseudogestação e da alta variação da quantidade de filhotes paridos dentro dos grupos de estudo, inviabilizando estudos estatísticos.

PALAVRAS-CHAVE: *Tillandsia usneoides*; coelhos; barba-de-pau; reprodução; análises fitoquímicas.

ABSTRACT

Tillandsia usneoides L., also known as Spanish moss, is a Bromeliaceae present in a large extent of the Brazilian territory, and in humid areas from southeastern U.S.A. to Chile and central Argentina. Farmers report a relation of this plant to the occurrence of abortions in mares and cows. The objectives of this study were the phytochemical analysis of total parts of *Tillandsia usneoides* and the evaluation of the toxical reproductive potential of its hydroalcoholic extract in female rabbits. The phytochemical analysis showed flavonoids, steroids, antraquinons, coumarins, micotoxins, antocianins, saponins, tannins, and aminogroups. The results of administration of the lyophilized hidroalcoholic extract to pregnant rabbits were not conclusive due the occurrence of pseudopregnancy and the high variation in number of younglings born within the studied groups.

KEY-WORDS: *Tillandsia usneoides*, Spanish moss, rabbit, reproduction, phytochemistry

1 INTRODUÇÃO:

Plantas tóxicas de interesse pecuário são aquelas que, quando ingeridas espontaneamente pelos animais domésticos, em condições naturais, causam danos à saúde e até a morte destes (RIET-CORREA et al., 1993).

A importância econômica das plantas tóxicas deve-se a quatro fatores: perdas por mortes de animais; perdas por diminuição da produção; perdas por medidas de controle e profilaxia, perdas reprodutivas (RIET-CORREA et al., 1993).

A ocorrência, frequência e distribuição geográfica das intoxicações, segundo RIET-CORREA et al. (1993) depende de:

- Palatabilidade: contrariamente à crença popular de que as intoxicações por plantas ocorrem somente por espécies não palatáveis quando ingeridas por animais que não as conhecem, muitas plantas tóxicas são extremamente palatáveis. Outras plantas, pelo contrário, por serem pouco palatáveis, são consumidas apenas em ocasiões especiais.
- Fome: este fator é importante, uma vez que muitas plantas tóxicas são ingeridas somente quando os animais estão com fome devido a escassez de forragem ou após períodos de privação de alimentos.
- Desconhecimento: algumas plantas são ingeridas apenas por animais que as desconhecem, por terem sido criados em locais em que não existe a planta.
- Acesso à planta tóxica: folhas que o animal só tem acesso após as árvores terem sido derrubadas pelo vento ou cortadas.
- Dose tóxica: a quantidade de planta necessária para causar intoxicação é muito variável de uma planta a outra. Algumas causam intoxicação quando ingeridas em quantidades mínimas, enquanto outras só apresentarão problemas se fizerem parte da quase totalidade da dieta.
- Período de ingestão: algumas plantas podem produzir intoxicações após uma única ingestão, enquanto outras devem ser ingeridas por um tempo mais ou menos prolongado.

- Variações de toxicidade: podem existir variações de toxicidade dentro de uma mesma espécie, devido a diversos fatores: variedades, épocas do ano, fase de crescimento, fase do ciclo de vida do animal, entre outros (RIET-CORREA et al., 1993).

Tillandsia usneoides é uma Bromeliaceae presente em grande parte do território nacional, estando presente em todas as regiões; presente também em áreas úmidas desde o sudoeste dos Estados Unidos até o centro da Argentina e Chile. É considerada uma planta epífita e aparece com abundância devido a seu método de proliferação, em que pedaços quebrados são carregados pelo vento, se fixam em outros galhos e crescem. Sua aparência peculiar e sua localização, fixada a galhos de árvores, deram-lhe o nome popular de Barba-de-Velho, ou Barba-de-Pau. Nativos americanos a denominavam “Itla okla”, que significa “cabelo de árvore”. Exploradores franceses a compararam com as longas e negras barbas dos exploradores espanhóis, mudando-lhe o nome para “Barbe Espagnol”, ou “Spanish Beard”. Os espanhóis, considerando o termo ridículo, modificaram seu nome para “Cabello Francês”, mas o termo “Spanish Beard” prevaleceu por muitos anos, vindo, posteriormente a ser denominada “Spanish Moss” (MARTINEZ, 1997; ADAMS, 2004). Sua ampla distribuição geográfica faz com que essa planta esteja presente em, praticamente, toda a região neotropical. (ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2004). Com isso, torna-se comum sua presença em pastagens animais, com fácil acesso destes aos ramos da planta.

Devido a casos comuns de abortos e problemas reprodutivos, sem causas conhecidas, em criações animais em pastagens com acesso a *T. usneoides*, torna-se necessário um estudo a respeito de suas faculdades abortivas e toxicológicas. Há casos de observações populares que relacionam a ingestão da planta por fêmeas gestantes com a ocorrência de abortos.

1.2 OBJETIVOS:

1.2.1 Objetivo Geral:

Desenvolvimento de protocolo de estudo de toxicidade reprodutiva de plantas comuns em pastagens de propriedades em que ocorrem abortos em animais sem causas aparentes.

1.2.2 Objetivos Específicos:

Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial abortivo do extrato hidroalcoólico de *Tillandsia usneoides* em coelhas expostas durante a gestação, e elucidar classes de metabólitos secundários presentes nesta planta através de análises fitoquímicas.

1.3 JUSTIFICATIVA

Levam ao desenvolvimento deste trabalho:

- O grande número de abortos ocorridos em criações animais sem causas definidas, em que tudo indica causas ambientais;
- A ampla distribuição geográfica da *Tillandsia usneoides*;
- A facilidade de acesso dos animais em pastoreio a essa planta;
- Os prejuízos econômicos gerados por distúrbios reprodutivos na pecuária;
- A observação de casos de fêmeas gestantes em várias espécies animais que abortaram após a ingestão contínua e espontânea da *Tillandsia usneoides*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS:

Tillandsia usneoides é uma planta epífita, angiosperma e monocotiledônea, da família Bromeliaceae. Não possui raízes e absorve água e sais por intermédio de pequenos pêlos existentes nas folhas, acumulando umidade entre elas (GARTH, 1964). Tem flores do tipo trímeros e sementes com um só cotilédone, com albúmem cujo parênquima acumula reservas. É uma espécie cinérea, pendente, com folhas finas e alongadas que formam extensos fios, que se distribuem por todo forófito, formando verdadeiras “cortinas” (ALENCAR- BARROS, 1944).

As plantas epífitas são responsáveis por grande parte da diversidade florística das florestas tropicais úmidas, incluindo a Mata Atlântica. Cerca de dez por cento de todas as plantas vasculares são epífitas. Estas pertencem, geralmente, a famílias consideradas avançadas em termos morfológicos. Como exemplos, a família Orchidaceae possui setenta por cento de seus membros epífitos e a Bromeliaceae em torno de cinqüenta por cento. Em termos fisiológicos, tem se verificado que as epífitas apresentam várias adaptações que as capacitam a ocupar o dossel da floresta. Este contém uma variedade muito grande de microhabitats, desde os que possuem disponibilidade contínua de nutrientes e de umidade, até os mais instáveis, oligotróficos e secos. Neste último caso, as epífitas que o habitam necessitam ter mecanismos fisiológicos/bioquímicos eficientes para aquisição de nutrientes e de água. Além disso, modificações morfológicas permitiram a redução do corpo da planta, chegando, em alguns casos extremos, à redução total das raízes, como em *Tillandsia usneoides* (Bromeliaceae) que só possui ramos ou à inexistência desses na forma vegetativa de orquídeas ditas acaules do gênero *Campylocentrum*, onde só há raízes (MERCIER, 2004).

As epífitas, geralmente, encontram na atmosfera sua fonte de nutrientes que podem resultar da deposição seca ou úmida. No último caso, os nutrientes ficam disponíveis às plantas por meio da água de chuva, da água de gotejamento, isto é,

aquela que atravessa o dossel, e da água de escorrimento do caule. Há dados que demonstram que o nitrato e o amônio, oriundos do escorrimento do caule, são as principais fontes de nitrogênio para as orquídeas. Vários estudos têm mostrado que grande parte das epífitas estão sujeitas a períodos extensos de seca nos dosséis das florestas tropicais. Há, portanto adaptações importantes que permitem com que as epífitas sejam capazes de sobreviver em condições de estresse hídrico, como a existência de mecanismo de ajuste osmótico celular (acúmulo de sais, ácidos orgânicos e/ou açúcares), mudança na conduta estomática, fixação noturna do CO₂ e aumento da elasticidade da parede celular, o qual permite um maior ajuste dessa parede ao volume do protoplasma, à medida que ocorre perda d'água, evitando a plasmólise irreversível e a consequente morte celular (MERCIER, 2004).

A fixação do carbono atmosférico por meio do metabolismo CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas) é outra característica que muitas epífitas apresentam e que as auxiliam a sobreviver em situações de seca. Existem as epífitas CAM facultativas que mudam sua via fotossintética de acordo variações da intensidade luminosa e/ou do grau de umidade que o ambiente apresenta. O metabolismo ácido das crassuláceas, comumente designado CAM, evoluiu independentemente em muitas plantas suculentas, incluindo os cactos (Cactaceae) e crassuláceas (Crassulaceae), e bromeliáceas como *Tillandsia usneoides*. As plantas são consideradas CAM se as suas células fotossintetizantes possuem a capacidade de fixar CO₂ no escuro via PEP (fosfoenolpiruvato) carboxilase. O ácido málico assim formado é armazenado no vacúolo. Durante o período seguinte de luz, o ácido málico é descarboxilado e o CO é transferido para a RuBP (Ribulose1,5-bifosfato) no ciclo de Calvin, no interior da mesma célula. As plantas CAM são amplamente dependentes da acumulação noturna de dióxido de carbono para a realização de sua fotossíntese porque seus estômatos permanecem fechados durante o dia, retardando desta maneira a perda de água. Obviamente isto é vantajoso nas condições de alta intensidade luminosa e de estresse hídrico sob as quais vive a maioria das plantas CAM. Se toda a absorção de CO₂ atmosférico nas plantas CAM ocorre à noite, a eficiência no uso da água apresentada por estas plantas pode ser muitas vezes maior do que aquela encontrada nas demais plantas. Durante os períodos de seca prolongada, algumas plantas CAM podem manter seus estômatos fechados durante o

dia e a noite, mantendo taxas metabólicas baixas por intermédio da refixação do CO₂, respiratório durante a acumulação de ácido málico no escuro, seguida pela fixação de CO₂ via ciclo de Calvin no dia seguinte (STRASBURGER et al., 1994; RAVEN et al., 1996).

A *T. usneoides* aparentemente se desenvolve melhor em árvores mortas do que em vivas; e demonstra preferência por árvores que crescem em solos ricos em calcáreo. GARTH (1964) cita que essa espécie procura terrenos mais secos, necessitando de períodos regulares de secas. O gênero *Tillandsia* é considerado o mais primitivo e mais xerófito entre as Bromeliaceae (GARTH, 1964).

Seu nome científico foi ditado por Carolus Linnaeus (Carl Von Linné, 1707-1778, pai do Sistema de classificação Binomial). O nome do gênero, *Tillandsia*, deriva do nome de outro cientista, Elias Tillands; e o nome da espécie, *usneoides*, significa “semelhante a musgo” (ADAMS, 2004).

2.1.1 Distribuição Geográfica

No Brasil, presente desde o Pará até o Rio Grande do Sul; presente também em áreas úmidas desde o Sudoeste dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile. (GARTH, 1964).

2.1.2 Nomes Vulgares

Tillandsia usneoides é popularmente conhecida como Barba-de-velho, Barba-de-pau, Samambaia, Barba-espanhola, Barba-de-macaco, Barba-de-pai-ventura, Cabelos-do-rei, Camambaia, Crina-vegetal, Erva-dos-bardonos, Samambaia-de-norte (BRA); Hirahuasso, Huahuasso, Barba-de-monte, Barba de tabaquilla, Barbón, Peluca Cabello del ángel (Argentina, Chile); Greybeard, Three Hair, Spanish moss, Horsehair (Estados Unidos); Payun-mamell (indígenas mapuches, Argentina) (MARTINEZ, 1997; ARAMBARRI, 1997).

2.1.3 Sinonímia botânica:

Dendropogon usneoides (L.) Raf., *Renealmia usneoides* L., *Strepsia usneoides* (L.) Nutt. Ex Steud., *Tillandsia crinita* Willd. Ex Beer, *Tillandsia filiformis* Lodd., Cat. Ex Schult.f., *Tillandsia pendula* hort. Louvain ex Schult.f., *Tillandsia trichoides* Kunth, *Tillandsia usneoides* fo. *Cretacea* Mez, *Tillandsia usneoides* fo. *Crispa* André, *Tillandsia usneoides* fo. *Ferruginea* André, *Tillandsia usneoides* fo. *Filiformis* André, *Tillandsia usneoides* fo. *Genuina* André, *Tillandsia usneoides* fo. *Longissima* André, *Tillandsia usneoides* fo. *Major* André, *Tillandsia usneoides* fo. *Robusta* E. Morren ex Mez, *Tillandsia usneoides* var. *Cretacea* (Mez) DC., *Tillandsia usneoides* var. *Ferruginea* (André) Mez, *Tillandsia usneoides* var. *Filiformis* (André) Mez, *Tillandsia usneoides* var. *Longissima* (André) Mez, *Tillandsia usneoides* var. *Robusta* (E. Morren ex Mez) Mez (ARAMBARRI, 1997).

2.2 ASPECTOS FITOQUÍMICOS

CABRERA et al. (1996) identificaram entre os componentes presentes na *Tillandsia usneoides* vinte e seis triterpenóides com o esqueleto do cicloartano (3,4-seco derivativos), entre eles (22E)- 25, 26, 27-trisnor-3-oxocicloartano-22-en-24-al, (24E)- 3-oxocicloartano-24-em-26-al, 24-hydroxycicloartano-23-em-3-one, entre outros.

WITHERUP et al (1995) citam investigações prévias em que foram identificados açúcares, ácido ascórbico e carotenóides, anéis de ciclopropano contendo triterpenos e cadeias de hidrocarbonos, esteróis livres e esterificados, e glicosídeos flavônicos. Em seu trabalho sobre efeitos hipoglicêmicos da *Tillandsia usneoides* em ratos, identificou através de cromatografia do extrato aquoso da planta o HMG (ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico), com ação hipoglicemiante. De acordo com WITHERUP et al. (1995), o HMG foi patenteado em 1971 como agente anti-colesterol. Ele atua como inibidor por competição da HMG CoA Redutase em sistemas bacterianos, e foi demonstrada inibição *in vitro* do sistema microssomal da HMG CoA redutase no fígado e intestinos. A

regulação enzimática da biossíntese do colesterol depende exclusivamente enzima HMG CoA redutase, que converte o HMG CoA em ácido mevalônico.

SENA et al. (1996) identificaram em análise fitoquímica na fração acetato de etila a presença de taninos flobafênicos e catéquicos, flavononas, flavonóides, flavonas, xantonas, esteróides livres e traços de bases quaternárias.

LLEWELLYN et al (1988) isolou fungos presentes naturalmente na planta, sendo encontrados *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Clodosporium* sp., *Mucor* sp. e *Mycelia sterilia*.

2.3 ASPECTOS ETNOFARMACOLÓGICOS

HOEHNE (1939) descreve o uso popular de *Tillandsia usneoides* contra engorgitamento do fígado; em forma de banhos como anti-hemorroidal. Segundo ele, quimicamente foi constatada a presença de boa percentagem de cumarina presente na planta. BALBACH (1972) também cita o uso do suco da planta, de maneira tópica, contra hemorróidas.

Entre suas aplicações, o chá de *T. usneoides* é referido por WITHERUP et al. (1995) no tratamento da dor reumática e abscessos. No passado, já se referiu o seu uso no tratamento de diabetes tipo mellitus, principalmente no sul de Louisiana.

Em 1995, KORBES descreve o uso popular de *Tillandsia usneoides* em forma de infusão para rins, catarro da bexiga, blenorragias, e seu xarope contra bronquite crônica. Externamente, como cataplasmas sobre o fígado.

SENA et al. (1996) descrevem seu uso popular como anti-reumática e desobstruente do fígado, e COSTA et al. (1989) propõe seu uso na medicina popular como analgésico.

2.4 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS:

Em estudos a respeito de plantas de uso popular como analgésicos, COSTA et al. (1989) comprovou efeitos analgésicos significativos do extrato hidro-alcoólico da

Tillandsia usneoides quando testada em ratos. Em seu experimento, foram administradas doses equivalentes a 1g de extrato sólido por kg de peso vivo, em ratas albinas, por via oral. Dois testes foram feitos: testes de verificação de resposta à dor quando aplicados os extratos 30, 60, 90 e 120 minutos após injeção intraperitoneal de peróxido de benzoíla em benzoato de benzila; teste de tempo de reação basal após imersão de um terço da cauda do rato em água a 51° C por 180 segundos. *Tillandsia usneoides* obteve reações positivas significativas em ambos os testes, sendo que suas respostas foram consideradas muito pronunciadas quando comparadas às das outras 17 plantas testadas. No entanto, análises qualitativas para detecção de radicais fenólicos que poderiam explicar essas respostas analgésicas resultaram negativas.

Também com ratos, WITHERUP et al. (1995) descreveram a característica do extrato hidroalcoólico em provocar efeitos hipoglicêmicos. Eles isolaram um composto denominado HMG (ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico) desse extrato, um composto reconhecidamente causador de efeitos hipoglicemiantes e anticolesterolêmicos, capaz de reduzir níveis sanguíneos de glicose e colesterol (WITHERUP et al., 1995; SAVOIE e LUPIEN, 1975).

Devido à presença desse composto, a *T. usneoides* também tem ação como protetora na arterioesclerose. Em estudos com animais, o HMG mostrou ação efetiva contra a lipemia e formação de arteriosclerose. Especificamente, o HMG se mostrou capaz de atrasar a formação de lesões arteriais (YOUSUFSAY e SIDDIQI, 1976). Em estudos com humanos, a administração oral de um grama de HMG antes da ingestão de whisky e carne gorda reduziu significativamente a elevação de triglicérides séricos, beta-lipoproteínas, fosfolipídeos e colesterol (YOUSUFSAY e SIDDIQI, 1976).

Estudos revelam que o HMG é efetivo no tratamento de *Diabetes mellitus*. Estudos em animais demonstram que *Tillandsia usneoides* é capaz de prevenir o desenvolvimento de diabete experimentalmente induzida, sem alterar os níveis de insulina circulantes. A administração de HMG possibilita a diminuição da cetose e diminui a acidose por cetoácidos, devido a diminuição de corpos cetônicos no sangue (WITHERUP et al., 1995). De acordo com WITHERUP et al. (1995), esse efeito pode

levar a um aumento do consumo cerebral de glicose sérica, no lugar de cetoácidos, levando ao estado de hipoglicemia.

Tillandsia usneoides possui também vitamina C e caroteno, possuindo atividade antioxidante (WITHERUP et al, 1995).

Em testes utilizando a planta como mensuradora de contaminação atmosférica, CALASANS e MALM (1997) descrevem *Tillandsia usneoides* como bioindicadora de qualidade de ar atmosférico. Isso ocorre devido à sua capacidade de retirar nutrientes diretamente da atmosfera, sem contacto com o solo. De acordo com CALASANS e MALM (1997), quando essa espécie absorve os nutrientes, concomitantemente incorpora vários poluentes. Como essa espécie se adapta bem a climas secos e quentes, pode ser usada como biomonitor em regiões tropicais. CALASANS e MALM (1997) descrevem concentrações aumentadas de mercúrio (Hg) presente principalmente nas partes mais velhas da planta, quando esta foi transplantada para regiões onde havia índices aumentados de mercúrio na atmosfera.

PYATT et al. (1999) comprovaram que a *Tillandsia usneoides* acumula metais pesados como manganês, níquel e cádmio, além do enxofre, quando exposta a altos índices destes na atmosfera. Em estudos comparativos sobre poluentes atmosféricos em Lousiana, PYATT et al. (1999) comprovaram ser a *Tillandsia usneoides* mais eficiente do que o *Parmotrema praesorediosum* como bio-indicador de poluição atmosférica, acumulando íons de sódio, cloretos, alumínio, silício, potássio, cromo, manganês, ferro, níquel e cádmio. Magnésio não foi detectado, assim como aumento da quantidade de fósforo, enxofre e cálcio com relação à atmosfera onde foram analisadas. No entanto, até o momento não foram descritos aspectos relacionados a intoxicações por *T. usneoides*.

SENA et al. (1996) testaram em ratos a atividade antitumoral da *T.usneoides*; em tumores experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich implantados em camundongos, obtiveram resultados considerados significativos após sete dias de quimioterapia utilizando extrato de toda a planta em acetato de etila.

LLEWELLYN et al. (1988) testaram o potencial de *Tillandsia usneoides*, quando utilizada como material para a produção de travesseiros e colchões, em produzir

micotoxinas. Após incubação de partes da planta por 10 dias, LLEWELLYN et al. (1988) verificaram a presença de contaminação natural por fungos na planta, sendo identificados *Aspergillus flavus*, *A. niger*, gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Mycellia sterilia*. Destes, maiores quantidades de *Mycellia sterilia*, *Cladosporium* e *Penicillium*, respectivamente. Quando inoculada com fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium tricinctum*, demonstrou desenvolvimento dos fungos, mas com baixa produção de aflatoxinas AFG1 e AFB1 quando comparadas com outros materiais para cama. Isso ocorre, possivelmente, devido a fatores como acesso a nutrientes, pH ou outros fatores não estudados. No entanto, em 90% do material inoculado houve crescimento do fungo *Fusarium tricinctum*, e produção de toxinas T-2 e HT-2 (tricotecenos). De acordo com LLEWELLYN et al. (1988), tricotecenos são citados como causadores de aleuquia tóxica alimentar em gatos, causam e redução de glóbulos brancos em humanos, além de efeitos biológicos por níveis baixos de exposição desde irritação na pele até a morte.

2.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA :

2.5.1 Seleção:

Embora pareça, inicialmente, uma etapa simples, o processo de seleção é certamente de extrema importância para o sucesso do estudo farmacológico das plantas medicinais. Vários métodos têm sido descritos e empregados para seleção de plantas para o desenvolvimento de estudos. Todavia, a literatura mostra com certa frequência que os resultados mais satisfatórios são geralmente obtidos quando a seleção é realizada com base em estudos etnofarmacológicos bem elaborados, no qual vários aspectos relacionados aos usos populares das plantas são considerados (YUNES e CALIXTO, 2001).

2.5.2 Preparo dos Extratos:

Na literatura especializada, podem ser encontradas diferentes metodologias que permitem preparar extratos para a realização de estudos pré clínicos de plantas. Porém, é importante destacar que alguns desses solventes são de natureza tóxica, o que por si só inviabiliza seus usos nos estudos *in vivo* em animais de laboratório, possibilitando o aparecimento de efeitos inespecíficos nos testes realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, dificultando, assim, suas interpretações. No entanto, vários relatos da literatura, e a experiência de estudos de nosso grupo, mostram que, para a grande maioria das plantas, a extração a frio com etanol-água (50:50 ou 70:30) por maceração prolongada, possibilita uma extração bastante exaustiva, capaz de extrair distintas categorias de princípios ativos, incluindo substâncias de diferentes graus de polaridade. Pelo menos para os testes iniciais, visando a confirmação das propriedades medicinais de uma planta, o extrato vem produzindo bons resultados. Naturalmente que, em função dos dados específicos obtidos pelas informações etnofarmacológicas disponíveis para cada planta, ou dependendo da natureza dos princípios ativos nelas existentes, há necessidade de preparar outros tipos de extratos, empregando-se, nestes casos, outras metodologias, ou então, usando diferentes sistemas de solventes (YUNES e CALIXTO, 2001).

2.5.3 Critérios e Cuidados para Escolha dos Testes Biológicos

Vários fatores devem ser considerados por ocasião da seleção do modelo biológico adequado ao estudo de uma determinada planta. Não obstante, alguns parâmetros devem ser analisados criteriosamente antes de fazer tal escolha, incluindo, entre outros, os seguintes:

- custos e o tempo que deverá ser utilizado para a realização do experimento;
- a quantidade de material vegetal disponível para a realização do estudo que pode ser um fator limitante quando se trata de compostos puros;
- a seletividade e a reprodutibilidade do teste, fatores esses de extrema importância (YUNES e CALIXTO, 2001).

2.5.4 A Interação Entre a Farmacologia e a Química para o Isolamento do Princípio Ativo

De maneira geral, as pesquisas desenvolvidas com plantas realizadas em vários laboratórios limitam-se a descrever resultados preliminares e, eventualmente, confirmar alguns efeitos preconizados algumas espécies vegetais usadas na medicina popular. Raramente consegue-se isolar e caracterizar quimicamente o(s) princípio(s) ativo(s) responsável (is) pelo efeito detectado. As razões que dificultam o progresso dessas pesquisas são de natureza bastante complexa, mas a ausência de interação entre os farmacólogos e químicos é, sem dúvida, um dos fatores limitantes. Soma-se a isso a necessidade de equipamentos modernos e sofisticados, indispensáveis às análises químicas, e a importância de o farmacólogo dispor de métodos biológicos rápidos e confiáveis, e sempre que possível econômicos, para testar um número muito grande de frações, contendo misturas de compostos, para permitir o monitoramento e o isolamento do princípio ativo. Os testes *“in vitro”*, devido sua maior reprodutibilidade, por serem mais rápidos para sua realização, e por requererem em geral menor quantidade de compostos, devem ser seriamente considerados na escolha para o monitoramento do extrato no processo de separação e identificação dos princípios ativos. Contudo, isso nem sempre é possível, pois algumas ações farmacológicas requerem a utilização de testes *“in vivo”*. Um fator importante a ser considerado nesses estudos é que o fracionamento químico do extrato, via de regra, deve ser acompanhado por aumento de sua atividade específica. Embora os métodos e as técnicas empregados para o isolamento e a caracterização química dos princípios de plantas tenham sofrido grandes avanços nos últimos anos, a separação de misturas complexas, muitas vezes contendo compostos hidrossolúveis, o que ocorre frequentemente nas plantas, constitui ainda uma tarefa árdua e difícil de ser executada (YUNES e CALIXTO, 2001).

2.5.5 Principais Classes de Produtos Naturais:

A composição química das espécies vegetais, especialmente das plantas encontradas nas florestas tropicais, ainda está longe de ser descrita em sua totalidade. Um enorme arsenal de constituintes naturais ainda não foram isolados e estudados do ponto de vista químico. Por outro lado, uma grande quantidade de compostos, já isolados e com estrutura química determinada, ainda não foram estudados quanto suas atividades biológicas, seja em relação às suas funções para a própria espécie vegetal, seja quanto suas potencialidades de uso para outras finalidades, especialmente de interesse terapêutico. Apenas um grupo restrito de substâncias possui suas funções e atividades determinadas, mas estamos longe de elucidar o papel desses compostos e muito mais distantes de completar o quadro de substâncias químicas disponíveis nas espécies vegetais (DI STASI, 1995).

Os constituintes químicos, encontrados no reino vegetal, são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas, que compõem o metabolismo das plantas. A síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies vegetais, tais como: açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados, faz parte do metabolismo primário das plantas. Por outro lado, os compostos sintetizados por outras vias e que aparentam, apenas aparentam, não ter grande utilidade na sobrevivência das espécies, fazem parte do metabolismo secundário, e portanto denominados compostos secundários (DI STASI, 1995).

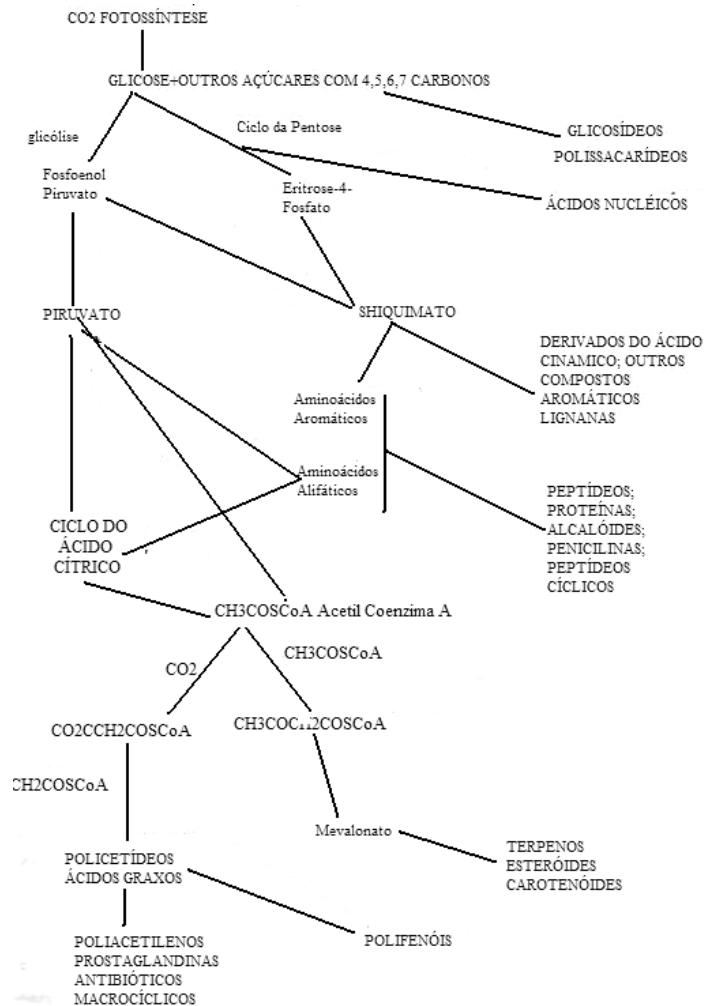
A separação dessas duas vias metabólicas é muito obscura, e a classificação dos compostos em primários e secundários depende muito da importância de determinado composto para uma determinada espécie, assim como do estágio de desenvolvimento em que esta se encontra. Há três pontos de origem e produção de compostos secundários (ver Figura 1), diferenciados mediante seus precursores:

- A) ácido shiquímico, como precursor de inúmeros compostos aromáticos;
- B) aminoácidos, fonte de alcalóides e peptídeos;

C) acetato, que através de duas rotas biossintéticas origina compostos, como poliacetilenos, terpenos, esteróides e outros (DI STASI, 1995).

Essa imbricada rede de reações compõe o metabolismo das espécies vegetais, que é coordenado por urna série de enzimas e co-enzimas responsáveis pêlos processos de síntese e degradação desses compostos, os quais estarão diferentemente distribuídos nas espécies vegetais (DI STASI, 1995).

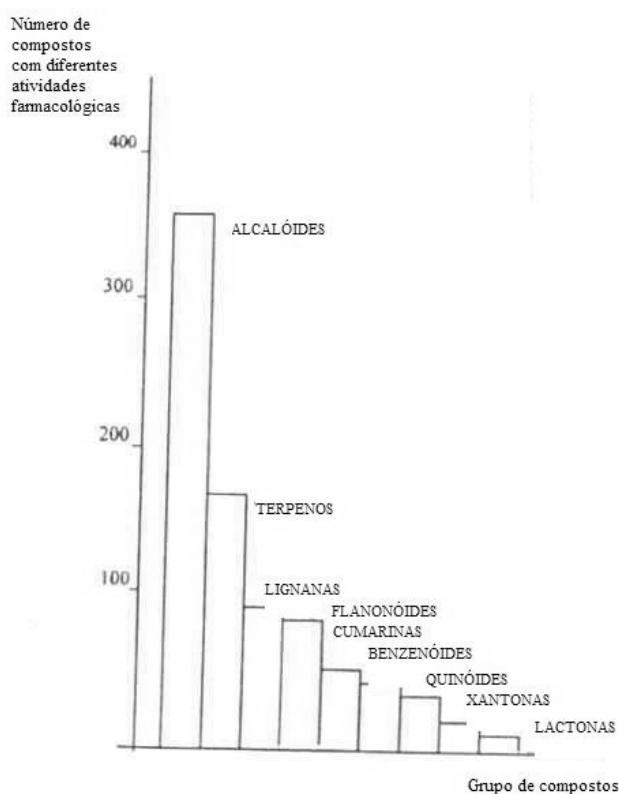
FIGURA 1: PRINCIPAIS VIAS METABÓLICAS DO METABOLISMO VEGETAL SECUNDÁRIO:



FONTE: DI STASI, 1995

A Figura 2 demonstra a grande diversidade de metabólitos secundários existentes nas espécies vegetais, e conseqüentemente podemos considerar que a natureza é extremamente grande e o número de compostos existentes praticamente desconhecido. Se analisarmos apenas os metabólitos secundários obtidos de espécies lenhosas e que tiveram alguma atividade biológica determinada, encontramos um número de 940 compostos naturais ativos, distribuídos em dezenas de classes distintas de substâncias químicas. Esses dados não incluem os componentes naturais obtidos de espécies não lenhosas, o que provavelmente indicaria a presença de um número bem maior de substâncias (DI STASI, 1995).

FIGURA 2.: DISTRIBUIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS ATIVAS DE ESPÉCIES LENHOSAS, NAS CLASSES QUÍMICAS DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS.



FONTE: DI STASI, 1995

Considerando-se apenas os dados obtidos a partir de espécies lenhosas, podemos fazer uma distribuição dessas substâncias nas classes mais conhecidas e importantes de compostos secundários. Essa distribuição parcial inclui apenas os grupos de substâncias isoladas e que possuem atividade biológica, especialmente farmacológica, já descrita na literatura (DI STASI, 1995).

Em números absolutos e incluindo-se as subclasses de cada uma dessas classes, podemos verificar quais os grupos de compostos com maior número de substâncias naturais ativas. Esses dados demonstram que os alcalóides e terpenos são as classes químicas com maiores potencialidades de fornecer compostos com atividade farmacológica. Seguem-se a essas classes os compostos como: lignanas, flavonóides, cumarinas e outras. Caso se considerassem os dados de espécies não lenhosas, teríamos uma distribuição similar dos compostos, com exceção das lignanas que estão presentes em maior quantidade nas espécies lenhosas (DI STASI, 1995).

2.5.5.1 Alcalóides:

Os alcalóides são compostos de caráter básico que ocorrem naturalmente, sobretudo no reino vegetal. Esses compostos possuem origem biossintética a partir das vias do ácido shiquimico ou mevalônico em combinação com diversos aminoácidos e apresentam uma enorme diversidade química, mas de fácil sistematização. A função desses compostos nas espécies vegetais é pouco conhecida, mas representa uma classe de metabólitos de grande importância como marcadores filogenéticos. A toxicidade de alguns grupos de alcalóides para a espécie humana está bem descrita na literatura, assim como sua importância na medicina moderna (DI STASI, 1995).

Os alcalóides se subdividem em inúmeras subclasses, com destaque para os alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos e tropanos. No reino vegetal, esses compostos estão distribuídos em um amplo número de famílias botânicas, como Papaveraceae, Berberidaceae, Menispermaceae, Leguminosae, Solanaceae, Liliaceae, Orquidaceae, entre outras. Entre alcalóides com ação farmacológica destacam-se, entre outros, os alcalóides com núcleo tropano, com compostos como a atropina, obtida através

da *Atropa belladonna*; a escopolamina, da *Scopolia carniolica*, e a hiosciamina, do *Hiosciamus niger*. Na subclasse com núcleo indólico, cita-se substâncias como a reserpina, estricnina, ioimbina, e fisostigmina. Já os alcalóides pirrolizidínicos tem ação de proteção da planta contra predadores, sendo substâncias muito tóxicas, agindo de maneira deletéria principalmente sobre hepatócitos (DI STASI, 1995).

2.5.5.2 Cumarinas:

As cumarinas têm estruturas muito variáveis, sendo conhecidas mais de 800 estruturas relacionadas em vegetais superiores. Encontram-se amplamente distribuídas em todo o reino vegetal, e algumas famílias contém grande variedade de cumarinas: principalmente leguminosas, asteráceas, e sobretudo umbelíferas e rutáceas (BRUNETON, 1991).

As cumarinas livres, solúveis em álcool, se extraem com solventes orgânicos como o éter. Seu interesse terapêutico é limitado: atua como venotônico e protetor vascular, e como fator vitamínico P. DI STASI (1995) cita efeitos antipiréticos e inibidores de carcinogênese. A umbeliferona possui ligeiras propriedades antibióticas frente à *Brucella* (BRUNETON, 1991), além de ações antiespasmódica, inibidora de carcinogênese, antiaritmica e antimutagênica (DI STASI, 1995). Algumas furanocumarinas são fotossensibilizantes; podem ser utilizadas no tratamento de psoríases. Os anticoagulantes cumarínicos utilizados atualmente foram sintetizados a partir do modelo dicumarinol, derivado cumarínico responsável por hemorragias observadas no gado que consome forragem a base de Meliloto (*Melilotus officinallis*) mal conservado. (BRUNETON, 1991; SIMÕES et al, 2000). Algumas cumarinas, como a presente na *Artemisia escoparia*, tem atividade imunossupressora, relaxante vascular, hipolipidêmica e hipotensora (SIMÕES et al., 2000).

As cumarinas sintetizadas por fungos inferiores são importantes devido à sua toxicidade: é o caso das aflatoxinas cancerígenas. Essas toxinas se elaboram por cepas de *Aspergillus* sp. que se desenvolvem em determinadas condições de temperatura e umidade. (BRUNETON, 1991). Algumas furanocumarinas usadas desde

épocas remotas para curtar problemas de pele como psoríase, hanseníase, vitiligo, etc. estão relacionadas com a incidência crescente de câncer de pele (SIMÕES et al., 2000).

2.5.5.2.1 Micotoxinas:

As micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas por fungos. Nas micotoxicoses, a quantidade de fungos consumidos pelos animais é mínimo, e o transtorno é causado quase exclusivamente pela toxina liberada no substrato usado como alimento (HERRERA e ULLOA, 1990).

Entre as micotoxicoses produzidas pelo gênero *Aspergillus* sp. a mais conhecida é a aflatoxicose, ocasionada pelas toxinas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, principalmente. As primeiras aflatoxinas estudadas foram designadas com o nome de B1, B2, G1 e G2, respectivamente, devido à sua fluorescência azul (do inglês blue) ou verde (green), em placas de cromatografia de camada delgada. Posteriormente, se descobriram aflatoxinas secundárias e toxinas diferentes nas espécies mencionadas e em outras espécies (HERRERA e ULLOA, 1990).

Grande número de animais são infectados pelas aflatoxinas em maior ou menor grau. Quantidades muito pequenas destas toxinas, quando consumidas com alimentos, produzem lesões em vários órgãos internos, principalmente no fígado, no qual podem desenvolver-se tumores cancerosos ou hepatocarcinomas. Considera-se que as aflatoxinas sejam as substâncias cancerígenas mais ativas que se conhece. A maior parte das aflatoxinas ingeridas pelos animais é acumulada no fígado, enquanto certa quantidade se acumula em outros órgãos e o resto é expulso com materiais fecais e urina. Nas fêmeas dos mamíferos, são excretadas com o leite substâncias tóxicas derivadas das toxinas ingeridas, chamadas toxinas M (do inglês milk.) (HERRERA e ULLOA, 1990).

Quando o rato branco ingere alimentos que contém aflatoxinas em uma proporção de 15 partes por milhão, está sujeito a desenvolver hepatocarcinoma em uma percentagem que chega a 100% dos indivíduos. Os leitões, as porcas gestantes,

os terneiros, os porcos de engorda, o gado bovino adulto, em ordem de sensibilidade, são sensíveis aos danos causados por aflatoxinas (HERRERA e ULLOA, 1990).

Outras espécies do gênero *Aspergillus* cujas toxinas causam micotoxicoses são: *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. clavatus*, *A. oryzae*, *A. glaucus*, e *A. fumigatus*. Esses fungos se desenvolvem em grãos e em alimentos armazenados, produzindo vários compostos tóxicos, entre os quais o mais conhecido é a ocratoxina de *A. ochraceus*, que é capaz de provocar hepatotoxicose e nefrototoxicose em frangos, porcos e outros animais, assim como abortos em bovinos e suínos, e até a morte em ratos e patos quando testada experimentalmente (HERRERA e ULLOA, 1990). As micotoxicoses produzidas pelo gênero *Penicillium*, na maioria dos casos, são ocasionadas por ingestão de grãos armazenados contaminados por toxinas desse gênero. As principais espécies que produzem toxinas desse gênero são *P. islandicum*, *P. viridicatum*, *P. citrinum*, *P. charlesii*, *P. terrestre* e *P. cyclopium*, e entre suas ações cita-se que são hepatotóxicas, nefrotóxicas, cardiotoxicas e cancerígenas (HERRERA e ULLOA, 1990).

As micotoxicoses produzidas pelo gênero *Fusarium* são causadas pela ingestão de produtos vegetais quando estes são levados a armazenar, ou no próprio campo, pois são parasitos de raízes, flores, talos, folhas, frutos e sementes de plantas silvestres e cultivadas. Entre as alterações produzidas pela ingestão dessas toxinas cita-se sinais de gastroenterotoxicoses, neurotoxicoses, efeitos estrogênicos e abortivos, podendo ser mortal para animais de laboratório (HERRERA e ULLOA, 1990).

Existem micotoxicoses causadas por outros tipos de fungos, como gênero *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Phitomices*, entre outros, que causam desde edema facial a fotossensibilização, transtornos hepáticos, hemorragias, entre outros (HERRERA e ULLOA, 1990).

2.5.5.3 Flavonóides:

Os flavonóides, compostos fenólicos, são em sua maioria pigmentos responsáveis pela coloração de flores e alguns frutos. O elemento comum nesses compostos está relacionado com um núcleo básico: o 2-fenil cromano. O termo

flavonóide se aplica a várias estruturas, como 2-fenil cromonas, 2- fenil cromanos, flavilios, ou antocianos, chalconas e auronas (BRUNETON, 1991; DI STASI,1995).

Os flavonóides se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal, geralmente na forma solúvel de heterosídeos. Praticamente ausentes nas algas, aparecem nas briófitas. Encontram-se nas gimnospermas, mas com pouca variedade estrutural; e estão amplamente representados nas angiospermas, onde se apresentam com sua diversidade estrutural máxima (BRUNETON, 1991).

Como ocorre para vários compostos secundários, as funções dos flavonóides nas plantas são pouco conhecidas (BRUNETON, 1991, SIMÕES et al., 2000). Alguns são antioxidantes, outros atuam como inibidores enzimáticos. As funções ecológicas desses compostos são mais evidentes: são responsáveis pela coloração das flores, favorecendo a reprodução das plantas via polinização por insetos (BRUNETON, 1991).

A propriedade biológica mais importante relacionada aos flavonóides é a propriedade vitamínica P. ainda que não seja reconhecida como vitamina, sendo denominado somente como fator P, muitos clínicos reconhecem seus efeitos benéficos, principalmente em alterações circulatórias. Esses compostos são capazes de diminuir a permeabilidade dos capilares e reforçar sua resistência. Também têm ações sobre a redução do ácido dehidroascórbico, aumentando o aproveitamento da vitamina C; efeito “scavenger”, por captar radicais livres originados na inflamação; atividade antiinflamatória por inibição da peroxidação do ácido araquidônico; ação de reforço e melhoria da qualidade de fibras de colágeno; ação antihialuronidase e antielastase, diminuindo a permeabilidade vascular; inibição indireta da agregação e adesividade plaquetária; entre outras (BRUNETON, 1991; SIMÕES et al.,2000). A naringenina reúne atividades como anti-PAF, indutora de formação de hemoglobina, antiespasmódica e anti-hepatotóxica (DI STASI,1995).

2.5.5.4 Derivados antociânicos:

Os antocianos são pigmentos hidrossolúveis responsáveis pelas colorações rosa, vermelha, azul e violeta de algumas flores e frutos. São corantes atóxicos usados

na indústria de medicamentos e alimentos, com atividade sobre a permeabilidade e resistência dos capilares. São amplamente distribuídos na natureza (exceto nas centrospermas) (BRUNETON, 1991).

Como os flavonóides, os antocianos são considerados como fatores vitamínicos P, usados como protetores capilar-venosos. Por outro lado, induzem um aumento da regeneração fisiológica da púrpura retiniana, e demonstra-se por eletroretinografia que aceleram a adaptação da retina à visão noturna (BRUNETON, 1991).

2.5.5.5 Taninos:

Historicamente, a importância dos taninos está ligada às suas propriedades na curtição, ou seja, capacidade de transformar a pele fresca em um material que não apodrece: o couro. Essa capacidade se dá devido ao estabelecimento de enlaces entre as fibras de colágeno da pele, conferindo a ela resistência à água, calor e abrasão. Por isso a definição clássica de taninos: compostos fenólicos hidrossolúveis que apresentam, junto às reações clássicas dos fenóis, a propriedade de precipitar alcalóides, gelatina e outras proteínas (BRUNETON, 1991).

As aplicações das drogas com taninos são limitadas e derivam de sua propriedade adstringente: exercem efeito antidiarréico, e antisséptico; por via externa impermeabilizam as camadas mais externas da pele e mucosas, protegendo as camadas adjacentes, com efeito vasoconstritor de pequenos vasos superficiais. Ao precipitar proteínas, tem efeito antimicrobiano e antifúngico. São hemostáticos e, como precipitam alcalóides, podem servir de antídoto em caso de intoxicação (BRUNETON, 1991).

2.5.5.6 Glicosídeos antraquinônicos:

As diferentes drogas desse grupo se caracterizam pela presença de compostos fenólicos, mais ou menos oxidados (antronas e antranóis, antraquinonas), relacionados com o antraceno. A distribuição botânica dessas drogas é restrita: Liliaceae (aloes),

Poligonaceae (ruibarbos), Ramnaceae (cáscara sagrada), Leguminosae (sene) (BRUNETON,1991).

Em geral, aceita-se a teoria que certas quinonas tenham papel na defesa da planta contra insetos e outros patógenos (SIMÕES et al.,2000).

Segundo a dose administrada, os derivados antracênicos exercem uma ação colagoga, laxante ou purgante mais ou menos violenta (SIMÕES et al.,2000). A atividade se deve a estrutura desses compostos: os derivados mais interessantes são os O-heterosídeos de diantronas e antraquinonas, assim como os C-glucosídeos. Os heterosídeos de antronas têm uma atividade muito pronunciada, o que explica sua utilização somente depois de armazenamento prolongado, ou tratamento com altas temperaturas, durante os quais se oxidam em derivados antraquinônicos. As geninas livres são praticamente inativas. Aquelas que chegam ao intestino delgado são absorvidas. Já os heterosídeos, glicosídeos hidrosolúveis, não são absorvidas nem hidrolisam a nível de intestino delgado: quando chegam a nível de cólon, são hidrolisadas pelas b-hidroxilases da flora intestinal, dando origem a formas ativas, o que explica o longo período de latência entre a ingestão da droga e seu efeito laxante (BRUNETON, 1991).

Os heterosídeos antraquinônicos diminuem a reabsorção de água, sódio e cloro a nível de cólon, e um dos seus supostos mecanismos de ação é a inibição do sistema Na-K ATPase dos enterócitos. Por outro lado, provocam um aumento do peristaltismo intestinal, excitando as terminações nervosas do sistema nervoso autônomo, e alterando a mucosa intestinal (BRUNETON, 1991; SIMÕES et al., 2000).

2.5.5.7 Terpenos e esteróis:

São elaborados a partir dos mesmos precursores, e constituem um amplo conjunto de metabólitos secundários. A imensa maioria dos terpenos é específica do reino vegetal, mas esta especificidade não é absoluta: em animais marinhos (Celentéreos, Esporângios) não é rara a presença de sesquiterpenos e diterpenos de

estrutura variada, e os ferormônios monoterpênicos presentes em alguns insetos não necessariamente são oriundos das plantas de que se alimentam (BRUNETON, 1991).

Todos os terpenos têm algo essencial em comum: pode-se considerar que se formam pelo acoplamento de um número inteiro de unidades pentacarbonadas ramificadas, derivadas do 2-metil-butadieno (BRUNETON, 1991).

Os óleos essenciais, extraídos de algumas espécies de plantas, principalmente do grupo das espermatófitas, são formados principalmente por mono e sesquiterpenos. A volatilidade e marcado odor desses óleos constituem um elemento de comunicação química: seu papel na polinização e dispersão das diásporas é inquestionável. Também, constituem um meio de defesa frente a predadores, e parecem ter ação teletóxica sobre germinações. Porém, ainda que se possa conhecer os efeitos dos mono e sesquiterpenos isolados, os resultados dificilmente pode se imputar ao óleo essencial como um todo, por este ser formado por uma mescla complexa e variável de compostos. Entre ações de óleos essenciais pode-se citar efeito antisséptico, propriedades irritantes, propriedades espasmolíticas, sedantes, entre outras (BRUNETON, 1991).

Os dados disponíveis sobre efeitos tóxicos dos óleos essenciais são poucos. Não se tem estudos sobre possíveis efeitos secundários, crônicos, nem tampouco cancerígenos ou teratogênicos desses compostos. No entanto, intoxicações agudas com óleos com Tuyona (presente na *Thuya occidentalis*, *Salvia officinalis*, *Artemisia absinthium*) são relacionadas a efeitos psicoanalépticos que desencadeiam crises epileptiformes e tetaniformes, transtornos psíquicos e sensoriais. O mentol pode induzir a espasmo de glote e asfixia reflexa; a essência de Sabina, hemorragias uterinas, e a essência de enebro está relacionada a hematúrias (BRUNETON, 1991).

Os sesquiterpenos constituem um grupo numericamente importante de substâncias, anteriormente chamados de “princípios amargos”, utilizados como tônicos, estimulantes do apetite e secreções digestivas. A terapêutica atual quase não se utiliza dessas drogas porque poucas demonstram atividade real. No entanto, há estudos que comprovam atividade antitumoral e citotóxica, além de atividade antihelmíntica e antiinflamatória (BRUNETON, 1991).

Triterpenos e esteróides são estruturas sempre policíclicas, normalmente tetra ou pentacíclica. Quase sempre hidroxilados no 3 apresentam, ao contrário dos demais terpenos, uma unidade estrutural bastante forte, sendo excepcionais as modificações profundas do esqueleto básico. Não existe diferença fundamental entre os triterpenos e os esteróis, considerando-se estes últimos como triterpenos tetracíclicos que perderam, no mínimo, três metilas. A importância biológica dos esteróides é reconhecida, e apenas algumas células como bactérias podem desenvolver-se em sua ausência. Nos vegetais, os papéis dos esteróides não são inteiramente conhecidos. Seu interesse terapêutico se dá pela importância dos glicosídeos cardiotônicos, que fazem parte desse grupo; interesse por sitosterol, estigmasterol, saponinas espirostânicas, que servem de matéria-prima para anticoncepcionais, anabolizantes, antiinflamatórios, entre outras. DI STASI (1995) cita ainda funções antitumorais e imunestimulantes.

2.5.5.8 Saponinas:

São heterosídeos com genina esteróidica ou triterpênica, caracterizados principalmente por sua atividade tensoativa: dissolvem-se em água formando soluções espumantes, aumentam a permeabilidade de paredes celulares e destroem hemáceas por hemólise. Esses compostos são freqüentes nos vegetais. Salvo algumas exceções, as saponinas esteróidicas são características das monocotiledôneas, enquanto as saponinas triterpênicas se encontram amplamente distribuídas nas dicotiledôneas (BRUNETON, 1991).

Muitas saponinas têm propriedades antimicrobianas e antifúngicas. Também têm propriedades hemolíticas, que podem ser atribuídas a sua interação com o colesterol da membrana eritrocitária, sendo tóxica para animais de sangue frio, principalmente os peixes. Nos mamíferos não apresentam mais que uma pequena toxicidade por via oral, que aumenta significativamente quando administrada por via parenteral. Também há relatos de propriedades antiinflamatórias, antitussígenas e expectorantes (BRUNETON, 1991), antiviral e ação hipocolesterolemiantes (SIMÕES et al., 2000). Seu emprego

farmacêutico está relacionado a atividades expectorantes e diuréticas (SIMÕES et al., 2000).

2.5.5.9 Heterosídeos cianogenéticos:

A cianogênese é a propriedade de certos vegetais de produzir ácido cianídrico. Esse ácido, no organismo, tem destino incerto, mas sabe-se que os íons cianetos, absorvidos em pequena proporção, reagem com um derivado da cisteína para formar tiocianatos e tiosulfatos. O aumento da quantidade de tiocianato no sangue se relaciona com aparição de neuropatias, por carência de aminoácidos sulfurados. Em alguns trevos e leguminosas, podem provocar acidentes em bovinos e ovinos. O sorgo é a principal forrageira envolvida em acidentes por ácido cianídrico, levando freqüentemente à morte desses animais (BRUNETON, 1991).

2.6 COELHOS:

2.6.1 Alimentação:

É a parte da criação que estuda os alimentos mais convenientes a cada animal ou espécie, de acordo com suas necessidades nutritivas e também sob o aspecto econômico (SCADIAN, 1991).

A alimentação tem como missão manter a vida dos animais e fazê-los produzir. O criador deve conhecer as necessidades de seus coelhos e quais os alimentos de que eles necessitam para darem bons rendimentos de carne, pele, pêlo, resistirem às doenças, manterem a fecundidade em níveis satisfatórios e para a criação de láparos, entre outros (SCADIAN, 1991).

Durante o processo evolutivo, os coelhos se adaptaram à alimentação herbívora mediante a um grande intestino grosso para as fermentações, excreção seletiva de fibras e retenção de partículas pequenas para a fermentação, coprofagia e adaptações relacionadas à dentição. Eles mastigam intensamente os alimentos, de modo que este está bem moído

quando chega ao estômago. Os períodos de ingestão primários são durante a noite e madrugada; e a coprofagia começa três a oito horas após as refeições (CHEEKE, 1995).

De acordo com SCADIAN (1991), para manter as funções de seu organismo e produzir tudo aquilo que lhe é exigido, o coelho precisa dos seguintes nutrientes:

A) Água: é um elemento indispensável à vida. Assim, de todas as necessidades do coelho, essa é uma das mais importantes. O corpo de um coelho adulto contém de 50 a 60% de água, e o de um coelho novo, até 80%. Uma coelha em gestação consome de 300 a 400 ml de água; em início de lactação, de 600 a 800 ml; e coelhas com ninhadas chegam a beber até 2,5 litros de água por dia. A água desempenha no organismo uma série de funções: é o dissolvente indispensável dos alimentos, para que sejam digeridos e absorvidos; conserva a elasticidade dos órgãos e tecidos; regula a temperatura do corpo pela evaporação e transpiração; transporta os princípios resultantes da digestão dos alimentos ingeridos (tudo o que é aproveitado dos alimentos ingeridos e tudo o que resta ou não é aproveitado também é transportado a setores diferentes do organismo) e realiza a eliminação dos produtos da desassimilação. A falta de água causa a não-ingestão de matéria seca, a perda de apetite e até a morte do animal em alguns dias (SCADIAN, 1991).

B) Proteínas: o coelho precisa não exatamente de uma determinada porcentagem de proteína, mas de certa quantidade de aminoácidos que ele não sintetiza e são essenciais às suas funções fisiológicas. O coelho em crescimento parece se satisfazer com 14 a 15% de proteína bruta, se esta for boa fonte de aminoácidos (SCADIAN, 1991).

C) Vitaminas: devido à microflora e à cecotrofia, os coelhos adultos não apresentam evidências de carência das vitaminas C e B. No caso da vitamina A, menciona-se uma carência em animais jovens e adultos. A falta de vitamina A causa, na reprodução, a queratinização da mucosa uterina, o que dificulta a fixação do ovo para o início da criação, diminuindo o número de fetos vivos, a reabsorção fetal etc. Sua falta ainda atrasa o crescimento, facilita o aparecimento de doenças da visão (xeroftalmia) e das vias respiratórias. A vitamina A é encontrada em quantidades satisfatórias no feno, na

silagem, em raízes como a cenoura, no milho amarelo, nas partes verdes dos vegetais, entre outros (SCADIAN, 1991).

D) Minerais: indiscutível é a sua importância na alimentação, pois representam de 3 a 4% do peso do coelho e, em geral, são encontrados em quantidade e proporções satisfatórias em todos os alimentos dados a esses animais. Sua falta causa distúrbios e até mesmo a morte do animal. A falta de cálcio em fêmeas gestantes causa a paralisia no final da gestação. A falta de fósforo produz atraso no crescimento, esterilidade, ossos deformados etc. O leite da coelha é fraco em ferro, o que pode ocasionar anemia nos lactantes, que têm suas reservas diminuídas rapidamente. Para curá-la, certa quantidade de ferro e de cobre deve ser administrada todos os dias (SCADIAN, 1991).

E) Fibra: a fibra, na alimentação do coelho, é fonte de energia e elemento de base, evitando problemas digestivos. Na sua carência, ocorrem distúrbios intestinais. Recomenda-se a inclusão de 12 a 17% de fibra bruta nas rações (SCADIAN, 1991).

F) Energia: é geralmente fornecida por lipídeos e glicídeos, bem como pelo excesso de proteína na dieta alimentar (SCADIAN, 1991). É um dos fatores que mais afetam a ingestão de alimentos. Quanto maior ao nível energético da ração, menor sua ingestão, de modo que o consumo de alimento seja suficiente para cobrir as necessidades energéticas. O tempo de permanência no ceco das rações com baixo conteúdo de fibras e ricas em carboidratos solúveis se prolonga, o que limita a ingestão de alimentos (CHEEKE, 1995).

Uma ração balanceada participa em 70% dos custos da criação, por isso deve ser controlada. A ração deverá ser sempre peletizada, pois, se fosse distribuída em forma de "farelo", possivelmente causaria problemas nas vias respiratórias dos coelhos (SCADIAN, 1991). De acordo com CHEEKE (1995), os coelhos preferem a ração granulada do que a ração em forma de farelo, e o crescimento melhora significativamente ao se administrar rações granuladas no lugar de fareladas.

A ração deve estar sempre fresca e bem armazenada, sendo empilhada sobre estrados até o máximo de sete sacos, evitando-se assim que fique esfarelada. Sua distribuição deverá ser feita em horas certas e, de preferência uma ou duas vezes ao dia, facilitando a digestão e evitando as perturbações. É aconselhável que a ração seja distribuída pela manhã e à tarde, na proporção de 100 a 110 g de ração ou à vontade (SCADIAN, 1991).

Uma prática habitual consiste em restringir os alimentos às fêmeas não lactantes, para reduzir os gastos e prevenir a obesidade. No entanto, deve-se evitar restrições nutritivas severas durante a gestação, porque as coelhas submetidas a stress nutritivo podem abortar aos 20-25 dias de gestação, ou podem reabsorver os fetos com 15-20 dias, e até deixar de se reproduzir (CHEEKE, 1995).

2.6.2 Coprofagia ou Cecotropia:

Coprofagia é o hábito que os coelhos têm de comer as suas próprias fezes. É uma das características mais importantes da digestão desse animal, sendo um fenômeno natural e uma necessidade fisiológica. Os coelhos, por sua vez, produzem dois tipos de fezes: as diurnas (duras e secas), que são expulsas, e as noturnas (moles, úmidas e recobertas de substâncias gelatinosas), que são recolhidas diretamente do ânus, sem deixar cair, e ingeridas (SCADIAN, 1991).

As fezes noturnas são muito mais ricas em proteínas e possuem muito menos fibras que as diurnas. Essas fezes contêm ainda resíduos de sucos digestivos, descamações celulares e flora intestinal (SCADIAN, 1991).

A coprofagia proporciona um maior e melhor aproveitamento dos alimentos, pois, dos alimentos ingeridos, quase todos passam por duas digestões (SCADIAN, 1991).

A coprofagia é comandada por uma secreção hormonal do córtex da glândula suprarrenal, sendo importante frisar que qualquer *stress* provoca a suspensão desse processo, causando diversas anomalias, como a subnutrição, devido à queda do consumo de alimentos e o aumento do índice de conversão, além da ocorrência de doenças, como consequência da paralisação do ceco, e também a morte (SCADIAN, 1991).

2.6.3 Reprodução:

A maturação sexual da coelha ocorre aproximadamente aos quatro meses de idade, e permanecem férteis e responsivas às gonadotropinas até três anos, apesar de

ocorrer uma diminuição de índices reprodutivos com a idade (FOOTE e CARNEY, 2000).

2.6.3.1 Anatomia do sistema reprodutor:

A vagina da coelha mede aproximadamente 10 cm de comprimento; cada corno uterino não gravídico mede aproximadamente 10 a 12 cm, e o oviduto completo (ampola e istmo) tem um comprimento similar. O comprimento pode variar até 30% entre diferentes raças. O arranjo bipartido do sistema reprodutor da fêmea do coelho faz com que o embrião migre para um corno ou outro, o que facilita estudos de transferência de embriões, já que cada fêmea pode albergar embriões tratados e não tratados, para controle, processo muito usado para experimentos tanto em coelhos quanto em ratos (FOOTE e CARNEY, 2000).

2.6.3.2 Função ovárica e ovulação:

A oogênese continua, na coelha, até duas semanas após o nascimento. Não há formação de novos oócitos após essa idade. Os folículos ovarianos crescem e muitos se transformam em folículos secundários até quatro semanas de idade, terciários até oito semanas de idade e folículos de Graaf até 12 semanas de idade. Em algumas raças, os folículos de Graaf começam a aparecer com 12 semanas de idade. No estágio de folículo de Graaf, é possível que ocorra a ovulação, e ela também pode ser induzida através de injeção de gonadotropinas. Como não há ovulação relacionada com ciclo estral, o desenvolvimento do ciclo hormonal não ocorre (FOOTE e CARNEY, 2000).

2.6.3.3 Ciclo estral e cio:

O ciclo estral é caracterizado por mudanças periódicas que sofre o aparelho genital feminino, isso depois da fase da puberdade. O cio aparece e se faz notar pela exaltação dos instintos sexuais, acompanhada de alterações tanto psíquicas quanto físicas. As coelhas

ficam mais excitadas e com os órgãos sexuais muito congestionados e em atividade. O colo do útero fica relaxado para facilitar a penetração dos espermatozóides (FOOTE e CARNEY, 2000).

A duração é de dois a três dias, mas isso não significa que elas não estarão férteis nos outros dias. Quando as fêmeas entram no cio, ficam agitadas, inquietas, esfregando-se na gaiola, perdem o apetite, montam suas companheiras, as orelhas ficam quentes, os órgãos genitais inchados, bem vermelhos e até arroxeados e úmidos (SCADIAN, 1991; PALADINO e PALADINO, 1993).

Contrariamente ao que ocorre na maioria das outras fêmeas mamíferas, a coelha não tem um ciclo estral periódico. Seu mecanismo fisiológico neuro-humoral se inicia unicamente se a coelha está em estado de cio, aceita o macho, e então, aproximadamente 12 horas após ocorrido o coito, se rompem os folículos de Graaf, e se produz a liberação do óvulo (PALADINO e PALADINO, 1993).

O ciclo envolve dezesseis dias, sendo que nos dois primeiros dias os óvulos ainda estão verdes, ficando maduros com o decorrer dos dias. São doze a quatorze dias férteis concebidos pelas coelhas (SCADIAN, 1991; PALADINO e PALADINO, 1993); nos dois últimos dias, elas não estão em condições de fecundação. Nos machos, a atividade sexual é permanente, principalmente na primavera, quando suas glândulas sexuais se encontram em plena atividade (SCADIAN, 1991). Durante o outono, há dificuldades de reprodução e pode haver indiferença sexual em ambos os sexos (PALADINO e PALADINO, 1993).

2.6.3.4 Acasalamento

Pode ser chamado de cobertura, cobrição, salto, monta, cópula ou coito. Nada mais é que o ato sexual realizado por animais de sexos diferentes e tem como objetivo principal a fecundação da fêmea para dar continuidade à produção. O ato sexual se divide em quatro fases: excitação, ereção, ejaculação e orgasmo (SCADIAN, 1991).

Na fase de excitação há uma aproximação entre os animais, que se cheiram; com essa ação, passam à fase da ereção, quando o macho começa a subir na fêmea, o que é o início do acasalamento; a ejaculação se faz quando o macho consegue penetrar a fêmea e

assim liberar os espermatozoides; no orgasmo, o macho já está finalizando a ejaculação e dá um salto ou impulso, caindo para um dos lados (SCADIAN, 1991).

Alguns cuidados para o sucesso do acasalamento:

- A fêmea deverá ser levada à gaiola do macho, pois ele, quando está fora de sua gaiola, fica assustado e não realiza a monta. (SCADIAN, 1991; PALADINO e PALADINO, 1993).
- A fêmea, quando está na gaiola do macho, devido ao cheiro de suas glândulas de ferormônio, fica excitada e facilita o acasalamento. (SCADIAN, 1991).
- Não se deve deixar o macho muito tempo com a fêmea, pois ele pode se esgotar e também, numa briga, pode sair muito machucado e até castrado. (SCADIAN, 1991; PALADINO e PALADINO, 1993).
- Antes do acasalamento, os órgãos dos animais devem ser examinados para ver se estão perfeitos (SCADIAN, 1991).
- Evitar gaiolas com saliências, pontas que possam causar traumatismos (SCADIAN, 1991).
- Acasalar sempre nas horas mais frescas do dia (SCADIAN, 1991).
- Não administrar mais que duas coberturas diárias ao macho (SCADIAN, 1991).
- Anotar todos os dados sobre a cobertura (SCADIAN, 1991).

2.6.3.5 Sinais de fecundação:

A fertilização ocorre na ampola do oviduto. O embrião se desenvolve em mórula em 48 horas e requer 60 horas para chegar ao útero (FOOTE e CARNEY, 2000).

Não existem métodos seguros que indiquem, imediatamente, se a coelha está gestando, sendo necessários alguns dias após o acasalamento para se ter certeza da gestação (SCADIAN, 1991; PALADINO e PALADINO, 1993).

A coelha, quando prenhe, torna-se mais calma, com movimentos lentos, engorda, altera-se a forma do seu corpo, principalmente no ventre. Existem métodos ou mesmo processos que indicam a gestação:

A) Prova do acasalamento: quando a coelha é novamente levada ao macho e não o aceita, fugindo e até emitindo sons, é possível que esteja prenhe. Porém, esse método não é

seguro, pois existem coelhas que aceitam o macho até antes do parto. (SCADIAN, 1991). A coelha deve ser levada ao macho dois a três dias após a cópula (PALADINO e PALADINO, 1993).

B) Exame das mamas: logo após a ovulação, as glândulas mamárias se desenvolvem, principalmente após a segunda semana de gestação. Para examinar, o criador deve segurar uma das tetas e, com os dedos indicador e polegar, fazer um movimento de vaivém; se a pele estiver grossa, a coelha está gestante (SCADIAN, 1991; PALADINO e PALADINO, 1993).

C) Palpação ventral: sem dúvida, é o método mais seguro para a verificação da gestação. A palpação é efetuada quinze dias após o acasalamento. A coelha deve estar com a cabeça virada para o operador, que, com uma das mãos, a contém, segurando-a pelas orelhas e pela pele do dorso. Com a outra mão, o operador faz uma leve pressão sobre a barriga da coelha e depois vai fechando, ao mesmo tempo, a mão e os dedos, com movimentos para a frente e para baixo. Quando a coelha está prenhe, o operador sente escorregar, entre os dedos, alguns caroços arredondados e em cadeia (SCADIAN, 1991; PALADINO e PALADINO, 1993). Esta prova se realiza aos 12-15 dias após a cobertura. Alguns criadores conseguem realizar essa prova com bons resultados aos oito a dez dias após a cobertura (PALADINO e PALADINO, 1993).

2.6.3.6 Gestação:

É o resultado da fecundação do óvulo pelo espermatozóide, formando o ovo. Começa logo no momento em que eles se fixam no útero. A partir daí, a coelha tem em seu útero ovos em desenvolvimento, passando pela fase de embrião e transformando-se em fetos. Nesse período, os fetos se alimentam e respiram por meio da placenta e, ao nascerem, pesam em média de 60 a 80 gramas (SCADIAN, 1991)

O período de gestação da coelha varia entre 28 e 32 dias; em média, na maioria dos casos, é de trinta dias, sendo o de menor duração entre os animais domésticos. Essa

duração varia de acordo com a precocidade, a raça, a idade dos reprodutores e o número de fetos, pois quanto mais láparos, menor a duração, e vice-versa (SCADIAN, 1991).

Durante a gestação, as coelhas sofrem modificações na sua conformação ou anatomia, principalmente no útero, que aumenta de volume, modificando sua forma, localização e consistência. Nesse período, as fêmeas tornam-se mais lentas em seus movimentos e se defendem dos machos que tentam cobri-las. Procuram locais mais escuros e sossegados e suas mamas aumentam de volume (SCADIAN, 1991; PALADINO e PALADINO, 1993).

Ainda no período de gestação, a coelha deverá receber uma alimentação riquíssima, composta de alimentos nutritivos, proteicos e ricos em vitaminas diversas. As forragens verdes são muito importantes, pois, juntamente com a ração balanceada, contribuirão para a alimentação mais completa da coelha e dos filhotes (SCADIAN, 1991; PALADINO e PALADINO, 1993).

Durante toda a gestação, recomenda-se não só uma alimentação regulada, mas também dois fatores importantíssimos, muita água e um ambiente sem perturbação alguma (SCADIAN, 1991).

2.6.3.7 Pseudogestação:

Pode ocorrer pseudogestação até o 18^o. dia. Pelo menos um embrião deve se implantar para que haja manutenção do corpo Lúteo. Ele começa a regredir a partir do 17^o dia; e também, um ou dois fetos muitas vezes não são capazes de requerer toda a carga hormonal necessária para que ocorra o parto no 31^o dia. Imediatamente após o parto, ou o fim da pseudogestação, a coelha é fértil e pode ser reinseminada (FOOTE e CARNEY, 2000).

2.6.3.8 Período pós implantação:

O período pós implantação é definido pelo intervalo entre a implantação no dia sete da gestação até o fim da organogênese, o que ocorre aproximadamente no dia 20 da gestação (FOOTE e CARNEY, 2000).

Há poucos trabalhos descrevendo a embriologia de coelhos nesse período, sendo dada ênfase maior no período próximo aos 30 dias, para testes de toxicidade. De maneira geral, os estágios embriológicos do coelho são semelhantes aos do rato, e os estágios básicos de desenvolvimento dos vários órgãos e sistemas se conserva. No entanto, diferenças entre essas espécies são bem aparentes quando se considera tecidos extra-embrionários, e essas diferenças determinam diferentes respostas a agentes intoxicantes experimentais. Uma dessas diferenças se refere ao saco vitelínico (VYS), estrutura extremamente importante por servir de órgão placentário primário ao estabelecimento da placenta corioalantoide, e responsável por ações teratogênicas. Em roedores, as células endodérmicas do VYS tem função nutricional por recolher moléculas via pinocitose, degrada-las em vacúolos lisossômicos e entrega-las ao embrião através da circulação vitelínica, por um processo referido como Nutrição Histiográfica. Evidências limitadas sugerem que o VYS de coelhos tem funções semelhantes, com a evidência de sua capacidade de recolher e degradar proteínas, além de recolher e transportar aminoácidos e vitamina B12 . No entanto, há diferenças entre as espécies, e o sistema de nutrição do VYS de coelhos ainda não foi completamente elucidado. Enquanto o embrião do rato e camundongo permanecem enclausurados no VYS durante a organogênese, a relação entre a VYS e o embrião de coelho alteram-se consideravelmente durante o período pós implantação (FOOTE e CARNEY, 2000).

A placenta corioalantóide de coelhos é diferente da dos ratos e camundongos. A placenta do coelho exibe um crescimento intenso em estágios relativamente precoces do desenvolvimento . Por exemplo, o conceito de uma coelha no nono dia de gestação contém uma placenta duas vezes maior do que o próprio embrião. No entanto, pouco se sabe a respeito da função da placenta do coelho durante essas fases precoces do desenvolvimento antes do acoplamento do corioalantóide (FOOTE e CARNEY, 2000; NODEN e LAHUNTA,1990). NODEN e LAHUNTA (1990) explicam que nos animais de laboratório o hipoblasto (endoerme do saco vitelínico não rodeado por mesoderme esplâncnico) se estende precocemente e se adere ao trofoblasto; Estas duas membranas unidas vão formar a onfalopleura bilaminar. A expansão progressiva do

endoderma extraembrionário provoca o colapso do saco vitelínico. No coelho, há degeneração do trofoblasto da onfalopleura bilaminar, permitindo que a capa do endoderma evertido do saco vitelínico, recoberta por dentro pelo mesoderma esplâncnico, entre em contato direto com a mucosa uterina. Assim se forma uma placenta de saco vitelino invertido (NODEN e LAHUNTA,1990).

A placenta de saco vitelínico invertido é o principal mediador no intercâmbio de nutrientes durante a maior parte da organogênese dos coelhos. Numerosos estudos demonstram que as propriedades fisiológicas desta placenta são diferentes daquelas da placenta corioalantóidea, que se forma nos roedores em fases mais avançadas de gestação (NODEN e LAHUNTA,1990). O âmnion desses animais permanece livre de qualquer união com o córion. A vesícula alantóidea é rudimentária. Pouco depois de estabelecer-se o contato entre o revestimento da cripta uterina e da onfalopleura bilaminar, células derivadas do trofoblasto denominadas células gigantes iniciam a destruição de tecidos uterinos. Deste modo se estabelece uma relação hemocorial que se inicia já no estado de saco vitelino invertido (NODEN e LAHUNTA,1990).

Mais adiante, um cordão de mesoderma esplâncnico da parte caudal do embrião se une ao mesodermo somático do córion adjacente ao corno ectoplacentário. Como resultado da reação decidual e crescimento do embrião a luz uterina se fecha, entrando em contacto e fusionando suas paredes. O tecido ectoplacentário e os vasos alantóideos invadem a parede uterina mesometrial e se forma um placentoma discóideo, e assim se estabelece uma nova placenta corioalantóidea e também hemocorial. Os vasos dessa região formam uma rede labiríntica. Os tecidos endometriais crescem debaixo da placenta formada pelo saco vitelínico e se reestabelece a luz uterina (NODEN e LAHUNTA,1990).

A estrutura fetal do coelho tem uma quantidade extremamente grande de fluído, o que fica evidente no estágio precoce de blastocisto. Como essas alterações no saco vitelínico de coelho pode responder a agentes tóxicos é desconhecido, e poucos trabalhos procuram responder a essa questão. Trabalhos comparando a farmacocinética entre coelhos e ratos com etilenoglicol levantaram a hipótese de que as diferenças do saco vitelínico do coelho podem alterar as respostas a agentes tóxicos

entre as espécies. O etilenoglicol causa anomalias no esqueleto de fetos de ratos quando administrado em bolus orais, em doses de 1000 mg/kg/dia. No entanto, doses de 2000 mg/kg/dia não desenvolveram efeitos tóxicos em coelhos (FOOTE e CARNEY, 2000).

2.6.3.9 Período fetal:

No período pós-implantação as linhas gerais de desenvolvimento são similares a roedores e humanos, com ajustes de tempo. O desenvolvimento e fisiologia da maturação da placenta corioalantoide depende de estudos, mas é em muito semelhante à de ratos e camundongos (FOOTE e CARNEY, 2000).

2.6.3.10 Parto:

É a expulsão do feto do útero, após completar o seu desenvolvimento na vida intra-uterina. (SCADIAN, 1991; PALADINO e PALADINO, 1993). Apesar de não ter hora certa, acontece, na maioria das vezes, em horário noturno. Nos partos, as próprias coelhas livram os láparos de sua envolturas fetais e, lambendo-os, limpam-nos de todas as matérias ou sujeiras da pele. A placenta é expulsa logo após a saída do último láparo (SCADIAN, 1991).

3 MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 MATERIAL BOTÂNICO:

Foi utilizado neste estudo a planta inteira, colhida em Campo Largo, Região metropolitana de Curitiba, em Abril de 2003. Uma exsicata encontra-se depositada sob o número 45101 , no Herbário da UFPR.

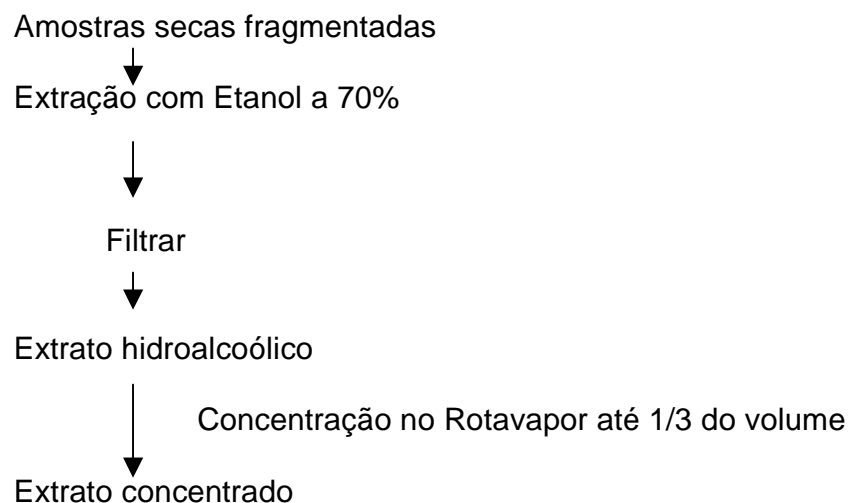
3.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS:

Para a determinação dos metabólitos secundários foram realizados testes segundo metodologia empregada por NAKASHIMA (1993).

3.2.1 Preparo do Extrato Hidroalcoólico a 20%:

Foram preparados extratos hidroalcoólicos das amostras recebidas para as análises dos metabólitos ativos, segundo o fluxograma a seguir:

FIGURA 3: FLUXOGRAMA DE PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DE *Tillandsia usneoides*:



A partir do extrato hidroalcoólico bruto procedeu-se a extração sucessiva com éter etílico (fração 1), n-hexano (fração 2), clorofórmio (fração 3), acetato de etila (fração 4) e butanol (fração 5).

As extrações foram realizadas em funil de separação, onde o extrato bruto, parcionado em cinco frações, foi misturado aos solventes acima citados (separadamente), e posteriormente submetido a banho-maria a 60° C para evaporação de resíduos de solventes. No extrato residual (fração 6) acrescentou-se etanol a 70% até o volume de 200 ml.

Com as frações (fração 1, 2, 3, 4, 5 e 6) obtidas, foram realizadas as pesquisa dos metabólitos secundários: alcalóides, esteróides e/ou triterpenóides, glicosídeos flavônicos, glicosídeos antraquinônicos, cumarinas e aminogrupos.

3.2.2 Análises organolépticas e determinação de pH :

Determinação da cor, odor, sabor e pH do extrato hidroalcoólico obtido com partes totais de *Tillandsia usneoides*.

3.2.3 Determinação do Extrato Seco:

Foram levadas cápsulas de porcelana (secas, sem tocá-las, previamente taradas) à estufa e no interior destas, depositados 10 ml das frações 1, 2, 3, 4, 5, e 6. Após secagem, pesou-se as cápsulas e procederam-se os cálculos. O resultado é representado em percentagem/peso de extrato seco em relação à amostra do vegetal.

40g 200mL

2g 10mL x g de extrato seco

100g y g de extrato seco.

3.2.4 Pesquisa de Alcalóides:

Foram evaporados 10 ml das frações até *secura*; os resíduos foram dissolvidos com 1 ml do etanol e então adicionados 10 ml de HCl a 1% e transferidos para tubos de ensaio com alíquotas de 0,5 ml de extrato. Um tubo foi usado como referência. Adicionaram-se então os reativos gerais de Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand.

3.2.5 Pesquisa de Glicosídeos Flavônicos:

Uma alíquota de 1 ml das frações foi transferida para tubos de ensaio. Foi realizada a reação de Shinoda ou da cianidina, adicionando 50 mg de limalha de magnésio e 0,5 ml de HCl fumegante (reação exotérmica).

3.2.5.1 Reação Oxalo-bórica

Foram evaporados 2 ml das frações à *secura* em tubos de ensaio, e aos resíduos adicionadas cinco gotas de acetona e 30 mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico. Após agitação, foram evaporados à *secura*, e aos resíduos adicionados 5 ml de éter etílico, e novamente agitados. As soluções etéreas foram examinadas sob luz U.V¹.

3.2.6 Pesquisa de Esteróides ou Triterpenos:

Foi realizada a pesquisa de esteróides e/ou triterpenóides com os extratos: éter etílico, éter, clorofórmico, acetato de etila e o hidroalcoólico. Os extratos foram evaporados até *secura* (separadamente), em banho-maria²; e o resíduo seco dissolvido com 5 ml de clorofórmio. Foram então separadas alíquotas de: 0,1; 0,5 e 1,0 ml do extrato clorofórmico para tubos de ensaios e completado o volume para 2,0 ml com

¹ Chromato Vue Ultra Violet Products INC. USA

clorofórmio. Após, efetuou-se a reação de Lieberman - Bouchardat (1 ml de anidrido acético e 2 ml de ácido sulfúrico concentrado).

3.2.7 Pesquisa de Glicosídeos Antraquinônicos:

Foram transferidos para um balão de fundo chato 250 ml de capacidade, 20 ml do extrato hidroalcoólico e 5 ml de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. Acoplou-se a um condensador³ e levou-se ao refluxo durante 30 minutos, filtrando-se ainda quente com papel de filtro. Após, adicionou-se 30 ml de água destilada, e transferiu-se para funil de separação para extração com diclorometano. A camada orgânica foi separada em um tubo de ensaio para se efetuar a reação de Bornträeger. Adicionou-se 5 ml de solução de NH₄OH 6N, agitando-se lentamente.

3.2.8 Pesquisa de Cumarinas :

Em béquer adicionou-se 5 ml de ácido clorídrico 1N a 20 ml do extrato hidroalcoólico, reduzindo-se o volume da mistura em banho-maria até 5 ml. Adicionou-se 5 ml de água destilada, levando a funil de separação com éter . O volume do extrato orgânico (etéreo) foi reduzido até 5 ml, e três gotas do extrato etéreo depositadas em papel de filtro previamente demarcado com grafite formando três manchas no papel (um, dois e três), que se deixou secar. Foi adicionada uma gota de hidróxido de sódio sobre a mancha um e dois, e levou-se à câmara UV. Antes de ligar o aparelho, a mancha dois foi coberta com uma moeda. Observou-se, sob luz ultra- violeta (365 nm), o aparecimento da reação.

Em um tubo de ensaio foi transferido o restante do extrato etéreo e acrescentados 2 ml de NH₄OH concentrado. Após agitação, o tubo foi levado à câmara UV, deixando-se exposto por cinco minutos.

² bm Ética Equipamentos Científicos S.A. Brasil

3.2.8.1 Pesquisa de micotoxinas:

Extração de micotoxinas de sementes de milho e amendoim mofados para posterior comparação. Utilizou-se 5 g de sementes moídas em 20 ml de clorofórmio, e submetidas a agitação por 30 minutos. A solução foi filtrada em papel filtro e concentrada em banho-maria a temperatura de 38 a 40° C até o volume de 5 ml. A solução concentrada foi depositada com pipetas capilares em placa para cromatografia e procedeu-se então cromatografia em camada delgada⁴. Os resultados obtidos foram comparados com a cromatografia das frações n-hexano e extrato hidroalcoólico de *T. usneoides* obtidas anteriormente.

3.2.9 Pesquisa de Aminogrupos:

Foram concentrados 5 ml das frações até 1 ml a 50°C, e depositados em cromatoplaça de CCD em pontos previamente determinados, três gotas das frações concentradas. Após secos, nebulizou-se o reativo de Nihidrina sobre as manchas e aqueceu-se em estufa⁵ à 90-100°C durante 10 minutos.

3.2.10 Preparo do Extrato Aquoso a 20%:

Maceração: 20%, duas horas em banho-maria.

Material botânico: 20g

Volume a preparar: 100 ml

Líquido extrator: água destilada ou deionizada

3.2.11 Análises Organolépticas e Determinação de pH :

Determinação de cor, odor, sabor e pH do extrato aquoso.

³ Fisatom Brasil LTDA.

⁴ Cromatoplaça Sílica gel 60 Merck Art. 1.05553

⁵ Fanem LTDA Brasil.

3.2.12 Determinação do Extrato Seco:

Colocou-se uma cápsula de Petri (seca) na estufa a 100° C, durante 15 minutos, transferindo-a posteriormente para um dessecador. Procedeu-se a pesagem para tara. Adicionou-se 10 ml de extrato aquoso à placa, que foi levada à secura. Após, colocou-se em estufa durante 10 min, e ao dessecador, anotando-se então o peso. O resultado é apresentado percentagem em peso de extrato seco em relação à amostra do vegetal.

20g	100mL	
x (2g)	10mL	t g de extrato seco
100g ..(%).....		y g de extrato seco

3.2.13 Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos :

Separou-se três porções de 2 ml do extrato aquoso em tubos de ensaio.

Tubo 1: foi acidificado com ácido sulfúrico 1N. (pH 3)

Tubo 2: foi alcalinizado com hidróxido de sódio 1N. (pH 10)

Tubo 3: foi neutralizado. (pH 7)

3.2.14 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos :

Agitou-se energicamente os três tubos anteriores (heterosídeos antociânicos) por cinco minutos.

3.2.15 Pesquisa de Heterosídeos Cianogênicos :

Transferiu-se para um tubo de ensaio 5 ml de extrato aquoso de modo a não umedecer as paredes do tubo e 1 ml de solução aquosa de ácido sulfúrico 1N. Foi

suspensa uma tira de papel picro-sódico com auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que o papel não tocou o extrato. O tubo de ensaio foi levado a banho-maria a 60°C, durante 30 minutos.

3.2.16 Reação de Schoembein:

Em uma cápsula de porcelana foram adicionados 5 ml do extrato aquoso, 4 gotas de NaOH ou KOH a 10%, cristais de sulfato ferroso e uma gota de FeCl₃ e aquecidos até ebulição. À mistura adicionou-se uma gota de HCl concentrado.

3.2.17 Pesquisa de Aminogrupos :

Concentrou-se 5 ml de extrato aquoso até 1 ml (a 50 °C). Foram depositadas em cromatoplaça de CCD em pontos previamente determinados, três gotas de extrato concentrado. Deixou-se secar e nebulizou-se Ninhidrina, aquecendo-se em estufa à 90-100°C durante 15 minutos.

3.2.18 Pesquisa de Ácidos Fixos :

Transferiu-se para um balão 20 ml do extrato aquoso e 2 ml de hidróxido sódio 1N, e foi acoplado ao condensador de refluxo durante 30 minutos. Após esfriado acidificou-se com ácido sulfúrico. Extraiu-se com éter etílico, três porções de 10 ml. Os extratos etéreos foram reunidos e tratados com carvão ativo. Filtrou-se e pôs-se evaporar em banho-maria. O resíduo foi aquecido por 10 minutos, em estufa a 100°C. Após esfriar, adicionou-se 5 ml de solução aquosa de NH₄OH N. Filtrou-se e foram transferidas três gotas do extrato amoniacal para papel de filtro, de modo a obter uma mancha com um centímetro de diâmetro. A mancha foi seca em estufa a 100°C por 10 minutos, e tratada com reagente de Nessler.

3.2.19 Pesquisa de Taninos :

3.2.19.1 Reações com sais de ferro III:

Reação com cloreto férrico: a 2 ml do extrato aquoso foram adicionadas três a cinco gotas de cloreto de férrico (solução aquosa a 1%).

Reação com $\text{NH}_4 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2$: Em solução aquosa a 1%, foi realizado o mesmo procedimento anterior e observados os resultados.

3.2.19.2 Reação de formol-clorídrico

Foram transferidos para um balão de refluxo de 100 ml de capacidade, 30 ml do extrato aquoso e 6 ml de formaldeído somados a 4 ml de HCl concentrado. O balão foi acoplado a um condensador de bolhas e levado a refluxo por uma hora. Após esfriar, foi filtrado. O filtrado foi reservado para pesquisa de taninos hidrolisáveis e o resíduo do papel de filtro lavado com EtOH a 70% (v/v). Adicionou-se gotas de solução aquosa de KOH ou NaOH a 5%.

Ao filtrado, adicionou-se acetato de sódio em excesso (sem agitar) e gotas de solução aquosa de FeCl_3 a 1%.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DE *Tillandsia usneoides* PARA PREPARO DO LIOFILIZADO:

3.3.1 Equipamentos:

- Balança Analítica⁶
- Rotavapor⁷

⁶ Mettler Toledo LTDA

⁷ Janke e Kunkel, Ika Werk, Alemanha.

- Liofilizador⁸

3.3.2 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico para o Tratamento:

O extrato hidroalcoólico das partes totais da *T. usneoides* foi obtido por extração em solução hidroalcoólica (70%) durante 14 dias a partir de 400 g da planta em cinco litros da solução. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotavapor (56°). A fração restante foi dividida em volumes de 2 ml, congelada e submetida a liofilização (57° negativos/007 mm TORR).

3.3.3 Animais e Manutenção:

Para realização dos experimentos necessários para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas coelhas pesando entre 3 e 4 kg, criadas e mantidas em gaiolas individuais. Os animais receberam água *ad libitum*, através de bebedouros automáticos individuais, e ração controlada (200 g de ração comercial⁹ divididas em duas porções, dadas pela manhã e ao fim da tarde), além de pasto verde necessário ao funcionamento intestinal, dado à vontade, uma vez no meio do dia.

3.3.4 Acasalamento e Gestação:

Cada fêmea foi mantida na gaiola do macho por um período de 20 minutos, observando-se a ocorrência da cópula; o procedimento foi repetido no dia seguinte. Após dez dias as coelhas foram submetidas a exame por palpação para confirmação da gestação. O dia da primeira cópula foi considerado o dia zero da gestação. A partir da confirmação da gestação iniciou-se o tratamento com o extrato hidroalcoólico liofilizado de *T. usneoides* diluído em água, dado misturado à ração noturna. A partir do 26° dia

⁸ Iphin Alemanha.

⁹ Ração para coelhos marca Supra LTDA., Brasil.

foram colocadas à disposição das coelhas caixas de madeira com serragem para servirem de ninhos.

3.3.5 Grupos Experimentais e Tratamento:

Para testes biológicos foram utilizados dois ensaios com 16 coelhas, com pesos entre 3,0 e 4,0 kg, criadas e mantidas em gaiolas individuais. Do segundo ensaio foram retiradas quatro coelhas, sendo uma de cada grupo, por motivos alheios ao experimento (problemas com ferimentos e sarna otodécica), perfazendo um total de sete coelhas para cada dose de extrato e sete controles.

3.3.6 Escolha das Doses de Tratamento:

De acordo com doses obtidas em experiências prévias (não publicadas) foram feitas as doses para uso na avaliação.

As doses utilizadas foram de:

D1: 1,6 g de planta/ kg PV diluídos em 1 ml de água;

D2: 0,8 g de planta/ kg PV diluídos em 0,5 ml de água;

D3: 3,2 g de planta/ kg PV diluídos em 2 ml de água.

CONTROLE: 2 ml de água adicionados à ração, simulando a aplicação do extrato.

3.3.7 Parâmetros a Serem Avaliados:

-Taxas reprodutivas:

Taxa de parto –
$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de parturientes a termo} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de fêmeas prenhes}}$$

Taxa de natalidade –
$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de filhotes nascidos vivos} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ total de filhotes nascidos}}$$

Peso da Prole- Peso total de filhotes por coelha
N ° de filhotes por coelha.

4 RESULTADOS:

A análise fitoquímica da *Tillandsia usneoides* revelou os seguintes compostos observados nas tabelas 1 e 2:

TABELA 1: ANÁLISE DE PRINCÍPIOS ATIVOS PRESENTES EM EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Tillandsia usneoides*

<i>Frações</i>	<i>Extrato</i>	<i>n-hexano</i>	<i>Éter Etílico</i>	<i>Clorofórmio</i>	<i>Acetato de</i>	<i>Butanol</i>	<i>Extrato</i>
<i>Princípios</i>	<i>bruto</i>				<i>etila</i>		<i>restante</i>
<i>pesquisados</i>							<i>EtOH 70%</i>
Alcalóides:	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides:	+	-	-	-	+++	++	++
Esteróides e triterpenóides	+	++	++	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	+	+	+	+	-	-	-
Micotoxinas	+	+	+	+	-	-	-
Aminogrupos	+	-	-	-	-	-	++
Resíduo seco %	1,5	0,2	0,525	0,45	0,75	1,2	0,1125
Cor:	Amarelo- âmbar	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro	Alaranjado	Amarelo escuro
Sabor:	Predomina o álcool	Predomina o do solvente	Predomina o do solvente	Predomina o do solvente	Predomina o do solvente	Predomina o do solvente	Predomina o álcool
Odor:	Predomina o álcool	Predomina o do solvente	Predomina o do solvente	Predomina o do solvente	Predomina o do solvente	Predomina o do solvente	Predomina o álcool
pH:	5	6	6	5	5	5	5

TABELA 2: ANÁLISE DE PRINCÍPIOS ATIVOS PRESENTES EM EXTRATO AQUOSO DE *Tillandsia usneoides*

Princípios pesquisados	Resultados Extrato aquoso
Glicosídeos Antocianos:	+
Glicosídeos Sapônicos:	+
Glicosídeos Cianogênicos:	–
Ácidos Voláteis:	–
Ácidos Fixos:	+
Taninos condensados:	+
Taninos Hidrolisados:	+
Aminogrupos:	+
Resíduo seco (%)	3.95
Cor:	Marrom-âmbar
Odor:	Semelhante a mofo
Sabor:	Quase insípido, levemente amargo
pH:	entre 4 e 5

Os resultados obtidos no grupo de coelhas estudado foi o que se segue na tabela 3:

TABELA 3: NÚMERO DE FILHOTES VIVOS E NATIMORTOS OBTIDOS DE COELHAS TRATADAS COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO LIOFILIZADO DE *Tillandsia usneoides*

<i>Doses de tratamento</i>	D1		D2		D3		Controle	
	VIVOS	MORTOS	VIVOS	MORTOS	VIVOS	MORTOS	VIVOS	MORTOS
	5	0	6	3	0	4	3	0
	6	2	5	3	4	0	7	0
	0	8	0	aborto	0	0	12	1
	0	aborto	0	0	9	0	4	0
	6	0	5	0	9	0	1	0
	4	0	0	0	5	0	10	0
	0	0	0	0	5	0	5	1
Total:	21	10	16	6	32	4	42	2
Peso médio	70,47 g	48,00 g	61,86 g	31,85 g	55,32 g	56,00 g	56,88 g	46,00 g

As taxas reprodutivas observadas estão descritas na tabela 4:

TABELA 4: TAXAS REPRODUTIVAS OBSERVADAS EM COELHAS TRATADAS COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO LIOFILIZADO DE *Tillandsia usneoides*

Doses de tratamento	D1	D2	D3	Controle
Tx. reprodutivas				
Tx Parto(%)	62,5	37,5	75	87,5
Tx Natalidade (%)	67,7	72,72	88,9	95,45
Peso Prole (g)	62,26 ± 11,28	52,24 ± 16,71	55,41 ± 7,34	56,40 ± 5,78

5 DISCUSSÃO:

Apesar dos relatos do risco de *Tillandsia usneoides* serem relativamente comuns entre os criadores de gado mais antigos, são raras as publicações e estudos a respeito dessa planta. Pouco se sabe sobre suas propriedades medicinais ou tóxicas; assim como pouco se sabe a respeito de sua ecofisiologia. Devido a essa falta de bibliografia específica, torna-se difícil desenvolver um estudo a seu respeito, desde definir doses, padronizar os métodos ou comparar resultados.

As análises fitoquímicas realizadas neste estudo demonstram a presença de vários grupos de compostos secundários no extrato de *Tillandsia usneoides*. A reação de SHINODA, para flavonóides, foi positiva, pois houve desenvolvimento de coloração róseo a vermelho. A presença de flavonóides foi confirmada pela reação oxalo-bórica positiva, com o aparecimento de fluorescência.

Na pesquisa de esteróides e/ou triterpenóides, o desenvolvimento de coloração azul indica a presença da função cetona na posição C3 e duplo enlace no C5-C6; enquanto que a coloração verde indica função OH na posição C3 e duplo enlace no C5-C6. Quando a fração n-hexânica do extrato foi evaporada e solubilizada em clorofórmio, o resultado foi o aparecimento de coloração amarela, indicando possivelmente presença de -CH₃ em C14.

Na pesquisa de cumarinas, o desenvolvimento de fluorescência azul ou amarela esverdeada na mancha exposta à luz UV indica presença de cumarina. A mancha três (controle negativo) e a mancha dois (encoberta) não devem apresentar fluorescência devido à falta de exposição à luz ultra violeta. Caso a reação seja positiva e houver demora em analisar e comparar as manchas, a mancha que não estava exposta às radiações UV poderá absorvê-la e tornar-se fluorescente. Houve desenvolvimento de coloração azul fluorescente, bem fraca, indicando o resultado positivo.

Para a pesquisa de aminogrupos, o desenvolvimento de coloração azul-violácea indica a presença de aminogrupos. No extrato aquoso, a pesquisa de derivados antociânicos indicou, em meio ácido, o desenvolvimento de cor amarelada, turva; em meio alcalino, cor castanho escura, límpida; e, em meio neutro, cor semelhante à

natural, mas pouco mais escura. As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis; encontram-se na forma de sais; são encontradas principalmente nas flores, frutos e tecidos com colorações que vão do roxo ao violeta e azul. Comportam-se como indicadores de ácido-base. Possuem caráter anfótero, com ácidos formam sais de oxônio corados de vermelho, e com bases reagem com as hidroxilas fenólicas livres e adquirem a coloração azul devida a estrutura quinóide. A união do ácido ao glicosídeo ocorre através da hidroxila no C3. As colorações dos compostos antociânicos variam com o pH.

Na pesquisa de heterosídeos saponínicos, a espuma persistente com altura superior a 1 cm indica presença de heterosídeos saponínicos. As saponinas possuem propriedade emulsiva. As soluções aquosas são coloidais e a formação de espuma é devido a tensão superficial elevada das soluções.

A pesquisa de aminogrupos no extrato aquoso também foi positiva, sendo que houve desenvolvimento de coloração azul-violácea.

Na pesquisa de ácidos fixos, o desenvolvimento de coloração marrom indicou a presença de ácidos fixos. O reativo de Nessler identifica a amônia associada em forma de sal amoniacal.

Na pesquisa de taninos, durante as reações de STANISHY, houve desenvolvimento de coloração azul, indicando a presença de taninos hidrolisáveis.

SENA et al.(1996) também identificaram em análise fitoquímica a presença de taninos, flavonóides, esteróides livres e traços de bases quaternárias. Este experimento confirma os resultados negativos para alcalóides, mas diferiu quanto aos resultados observados nos grupos de glicosídeos antociânicos e saponinas, citadas por ele como negativos nos seus experimentos. De acordo com BRESOLIN (2003), os constituintes químicos presentes em uma espécie de planta podem se diferenciar intensamente de uma amostra para outra, quanto à qualidade e quantidade de metabólitos secundários bioativos dependendo de sua origem, condições de crescimento, qualidade do solo, variações sazonais, influencia climática e data da coleta. Ainda de acordo com esse autor, outro problema que pode ocorrer é a interação da planta a ser utilizada com outras plantas e até com microorganismos, a polaridade do solvente durante a

extração, o modo de extração e até a instabilidade da composição química da preparação frente a fatores como luz, calor e solventes.

CABRERA et al. (1996) identificaram esteróis de cadeia semelhante ao cicloartano em *Tillandsia usneoides*. A presença de esteróis também foi confirmada neste experimento, mas, primariamente, com a metodologia utilizada (reação de Lieberman – Bouchardat) o resultado foi negativo, pois utilizava-se, para essa reação, a fração clorofórmica do extrato, obtida posteriormente à fração n-hexânica. Repetindo-se a reação utilizando-se a fração n-hexânica evaporada e posteriormente diluída em clorofórmio a reação foi positiva. Isso possivelmente ocorre devido à forma como se encontram os esteróides nessa planta, tendo afinidade com o n-hexano. Isto se explica devido a forma de extração, em que, neste experimento, foram feitas extrações líquido/líquido com solventes de polaridades crescentes.

WITHERUP et al. (1995) citam investigações prévias em que foram identificados anéis de ciclopropano contendo triterpenos e cadeias de hidrocarbonos, esteróis livres e esterificados, e glicosídeos flavônicos, confirmando os resultados obtidos.

Durante a análise, verificou-se a presença de cumarinas no extrato hidroalcoólico de *Tillandsia usneoides* e na fração n-hexânica. Como as toxinas produzidas por fungos pertencem, em grande parte, ao grupo das cumarinas, e LLEWELLYN et al. (1988) verificaram a presença de contaminação natural por fungos na planta, optou-se por uma análise comparativa entre as cumarinas presentes no extrato de *T. usneoides* e aquelas presentes em sementes de amendoim e milho, sabidamente portadoras de aflatoxinas. Comparativamente, as cumarinas presentes no extrato hidroalcoólico e na fração hexânica quando cromatografados mostraram-se muito semelhantes àquelas presentes nas sementes mofadas de milho, indicando que possivelmente sejam devidas à presença de micotoxinas nos extratos. Em contrapartida, a cromatografia de semente de amendoim não foi semelhante à obtida nos extratos da planta. Em análises laboratoriais feitas no Centro de Diagnósticos Marcos Enrietti foram identificados fungos do gênero *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. nas sementes de milho utilizada para comparação. LLEWELLYN et al. (1988) identificaram contaminação natural por *Aspergillus flavus*, *A. niger*, gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Mycellia sterilia*

em amostras de *T. usneoides*. Quando inoculada com fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium tricinctum*, demonstrou desenvolvimento dos fungos, mas com baixa produção de aflatoxinas AFG1 e AFB1 quando comparadas com outros materiais. Isso ocorre, possivelmente, devido a fatores como acesso a nutrientes, pH ou outros fatores não estudados. No entanto, em 90% do material inoculado houve crescimento do fungo *Fusarium tricinctum*, e produção de toxinas T-2 e HT-2 (tricotecenos) (LLEWELLYN et al., 1988).

Há, no entanto, necessidade de mais estudos para se verificar se há ou não atividades biológicas em qualquer dessas frações, sejam elas medicinais ou tóxicas.

Os resultados obtidos no experimento com coelhos em busca de alterações reprodutivas não obtiveram significância estatística devido a grande quantidade de coelhas que não pariram, apesar de terem sido cobertas mais de uma vez, e aos 10 dias terem diagnóstico positivo para gestação. Em duas delas, no decorrer do experimento, chegou-se a visualizar secreções vaginais sanguinolentas, em datas anteriores às esperadas para o parto, indicando possíveis abortos. Mas na grande maioria não houve sinais visíveis de aborto, apesar do que, deve-se levar em conta que as coelhas parem principalmente durante a noite, e tem como hábito comum ingerir os filhotes mortos. Devido a isso os sinais de aborto ficam menos evidentes. Como agravante, vários autores (SCADIAN, 1991; PALADINO e PALADINO, 1993; FOOTE e CARNEY, 2000) citam o fenômeno da pseudo-gestação em coelhas, que na verdade vem a ser uma reabsorção fetal, ocorrendo principalmente próximo ao 18^o dia de gestação.

A significância estatística também fica prejudicada pela grande variabilidade de filhotes nascidos por coelha, dentro dos grupos do experimento. Por exemplo, no grupo controle, houve coelhas que pariram apenas um filhote; e coelhas parindo 13 filhotes. Assim, em análises de variância, chegou-se a valores com o coeficiente de variação de 206,98%, inviabilizando as análises.

Apesar das análises estatísticas não resultarem em significância, os resultados obtidos no experimento levam a crer que realmente há alterações em taxas reprodutivas devido à ingestão do extrato hidroalcoólico de *Tillandsia usneoides*. Em

experimento piloto desenvolvido (não publicado), a planta foi ministrada picada a um lote de três éguas a partir do segundo terço da gestação, na dose de 0,5 g por kg de peso vivo. Como resultado, duas das três éguas abortaram próximo ao sétimo mês de gestação, mimetizando o resultado ocorrido no caso clínico que levou ao desenvolvimento deste estudo: 17 abortos ocorridos em um lote de 11 éguas, no decorrer de dois anos, que estavam em um piquete onde havia *Tillandsia usneoides* ao seu alcance, e relatos de sua ingestão. Quando as éguas foram retiradas do piquete os abortos cessaram. Uma delas, sendo recolocada no piquete, voltou a abortar.

Em estudo desenvolvido com lote de 16 coelhas, distribuídas em quatro grupos de quatro coelhas, sendo um grupo (D1P) com a dose de 0,5 g da planta na forma de extrato hidroalcoólico, um grupo (D2P) com a metade dessa dose, um grupo (D3P) com o dobro da dose inicial, e um grupo controle (CP), administradas conforme os métodos descritos neste experimento, os resultados obtidos, apesar de não significativos estatisticamente, assemelham-se aos verificados no estudo: a taxa de natalidade verificada em D1P foi de 94,35%, D2P 50,2% e D3P 33,3%, contra 100% verificada no grupo controle.

Com isso, verifica-se que as coelhas não foram viáveis para uso como animais de teste para este tipo de experimento, devido à dificuldade em se detectar os abortos ocorridos nesta espécie, e devido à grande variabilidade encontrada no número de filhotes por coelha, inviabilizando testes estatísticos.

5 CONCLUSÃO:

Pouco se conhece a respeito de *Tillandsia usneoides*, que está presente em grande parte do território nacional, e facilmente acessível a animais de criação em pastoreio. Através deste experimento, demonstrou-se a grande variedade de classes de compostos fitoquímicos produzidos por esta planta, ainda pouco estudados.

São poucas as referências na literatura quanto a propriedades medicinais e tóxicas da *T. usneoides*, e casos observados a campo levam a crer que sua ingestão continuada possa levar a abortos. Neste experimento demonstrou-se, ainda que não com significância estatística, que o extrato hidroalcoólico de *Tillandsia usneoides*, quando administrado em coelhas gestantes, pode levar a alterações de taxas reprodutivas.

Dados os resultados inconclusivos do presente experimento, mas com indícios de efeitos negativos sobre as taxas reprodutivas causados pelo extrato de *Tillandsia usneoides* em coelhas, observa-se a necessidade de mais estudos, com, possivelmente, novos modelos experimentais e outras espécies animais, para comprovação das suspeitas induzidas por este trabalho.

REFERÊNCIAS:

- ADAMS, D. Spanish moss: its nature, history and uses. ONLINE: <http://www.co.beaufort.sc.us/bftlib/Spanish.htm#origin%20of%20the%20Scientific%20Name,Tillandsia%20usneoides> Visitada em: 30/11/2004
- ALENCAR- BARROS, L. A. **Compêndio de botânica geral e sistemática**. 1ª Ed. SP: Ed. Clássico- Científica S.A. , 1944.
- ARAMBARRI, A.M. *Tillandsia L.* (Bromeliaceae): anatomy and ethno- pharmacology. **Acta horticulturae**. Argentina: vol. 503, p.133-139, 1997.
- BALBACH, A. **A flora nacional na medicina doméstica**, 2ª. ed. São Paulo: Ed. A Edificação do Lar, vol. 2, 1972.
- BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências farmacêuticas**, Itajaí: ed. Univali, , p.35-37, 2003.
- BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica e farmacognosia**. Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia, p.107-353, 1991.
- CABRERA, G. M. ,GALLO, M., SELDES A. M.; Cycloartane derivatives from *Tillandsia usneoides*. **Journal of natural products**, Argentina, v.59, p.343-347, 1996.
- CABRERA , G.M., SELDES, A.M.; Short side-chain cycloartanes from *Tillandsia usneoides* . **Phytochemistry**. Argentina: Vol. 45, No. 5, pp. 1019-1021, 1997.
- CALASANS, C. F.; MALM, O.. Elemental mercury contamination survey in a chlor-alkali plant by the use of transplanted Spanish Moss, *Tillandsia usneoides*. **The Science of the total environment**. Rio de Janeiro: vol. 208, p.165-177, 1997.
- CHEEKE, P.R. **Alimentación y nutrición el conejo**. Espanha, Acribia S.A., p.185-201, 1995.
- COSTA M, DI STASI LC, KIRIZAWA M, MENDACOLLI SL, GOMES C, TROLIN G. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of Sao Paulo. Part II. **Journal of ethnopharmacology**. Brasil: Vol.27,no.1, p.25-33, 1989 .
- DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: Arte e ciência**. São Paulo, Ed. Unesp, p.108-119, 1995.
- ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA;Encyclopaedia Britanica Premium service. 2004. Online, <http://britannica.comn/eb/article?tocId=9068995> Visitada em: 30/02/2004
- FOOTE, H; CARNEY,E. W. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. **Reproductive toxicology**. USA: vol. 14 , p. 477–493, 2000.
- GARTH, R.E. The ecology of Spanish moss (*Tillandsia usneoides*): it's growth and distribution. **Ecology**, Louisiana: vol.45, n. 3, p.470 a 481, 1964.
- HERRERA, T; ULLOA, M. Hongos tóxicos. **El reino de los hongos-micología básica e aplicada**. México: ed. Universidade Nacional Autónoma de México, p.422 a 425, 1990.
- HOEHNE, F.C., **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Ed. Graphicals, 1939.
- JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 12ª. ed. 1998.
- KORBES, C.V. **Plantas medicinais**. Francisco Beltrão: Ed. Grafite, 45ª. ed.,1995.
- LLEWELLYN, G. C.; SHERERTZ, P. C.; ARMSTRONG,C. W.; MILLER,G. B. An evaluation of kapok and spanish moss bedding for micotoxigenic potential using

- Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *Fusarium tricinctum*. **International biodeterioration**. Virginia,USA: vol. 24, p.167- 174, 1988.
- LEMONICA, I.P.; DAMASCENO, D.C.; DI-STASI, L. C. Study of the embriotoxic effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*). **Brazilian journal of medical and biological research**. Brasil: V. 29, p. 223-227, 1996.
- NAKASHIMA, T; **Étude phitochimique, evaluation des activités antifongiques et antivirales de trios Verbenaceae: *Lippia alba N.E. Brown*, *Lippia multiflora Mold.* *Citharexylum myrianthum Cham.*** França: 1993. Tese de Doutorado – Institut National Polytechnique de Toulouse.
- NODEN, D.M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domesticos**. Zaragoza, Espanha: Ed. Acríbia, p.56-76; 1990.
- MARTINEZ, R.J. The story of Spanish moss and its relatives. ONLINE: <http://www.communityonline.com/local/culture/spanishmoss/spanishmoss3.htm> Visitada em:30/11/2004
- MERCIER, H. Epífitas da mata atlântica. ONLINE: <http://www.rc.unesp.br/xivbsp/ Mesa04THM.PDF> visitado em: 30/02/2004.
- PALADINO, A. S. P; PALADINO, S.A.S; **Manual de cunicultura**, Argentina: 2ª. ed., Ed. Albatroz; p.64-93; 1993.
- PYATT, F. B; GRATTAN, J. P.; LACY, D. ; PYATT, A. J.;SEAWARD, M. R. D;. Comparative efectiveness of *Tillandsia usneoides L.* and *Parmotrema praesorediosum* (NYL) hale as bio- indicators of atmospherice pollution in Lousiana (U.S.A.),**Water, air and soil pollution**. Lousiana: v.111, p.317-326, 1999
- RAVEN, P., EVERT, R.F. EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 5ª.ed. Rio de Janeiro, ed. Guanabara Koogan, p.107-108,1996.
- RIET-CORREA, F; MÊNDEZ, M.C.; SCHILD, A.L. **Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos**. Rio Grande do Sul: Ed. Agropecuária Hemisfério Sur S.R.L., vol.1, p.1-4, 1993
- RIZZINI, C. T. ; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: Ed. E.P.U e EDUSP., 1976.
- SAVOIE LL, LUPIEN PJ. Preliminary toxicological investigations of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG). I: Study of acute toxicity and of teratogenic activity in rats and mice. **Arzneimittelforschung**. Alemanha: vol.25, no.8,p.1284-6,1975.
- SCADIAN,A. **Coelho + técnica = lucro**. São Paulo: Ed. Nobel, p. 20 -45,1991.
- SENA, K. X. F. R. ; LIMA, R. M. O. C.; LIMA, C.S.A; CHIAPETTA, A.A; ANDRADE, M. S.A. S.; Primeiras observações sobre a atividade antitumoral e Estudo fitoquímico de *Tillandsia usneoides*. **Anais do XIV Simpósio de plantas medicinais do Brasil**. SC: 1996.
- SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL,E.P.;GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª. Ed. Santa Catarina: Editora da UFSC, p. 355 – 707, 2000.
- STRASBURGER, E.et al **Tratado de botânica**. 8ª.ed. Barcelona: Editora Omega, p.292-293, 1994.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ; INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Normas para apresentação de documentos científicos**. Curitiba: Editora UFPR, 2002. vol 8: Redação e editoração.

- WITHERUP, K.M., MCLAUGHLIN, J.L., JUDD R.L., ZIEGLER, M.H., MEDON, P.J., KELLER, W.J. Identification of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) as a hypoglycemic principle of Spanish moss (*Tillandsia usneoides*). **Journal of natural products**, vol. 58, no.8, p.1285-90, 1995.
- YOUSUFZAI, S.Y; SIDDIQI, M. 3-Hydroxy-3-methylglutaric acid and triton-induced hyperlipidemia in rats. **Experientia**, Georgia, USA: vol.32, no.9, p.1178-9, 1976.
- YOUSUFZAI, S.Y.; SIDDIQI M. Serum and liver lipid responses to 3-hydroxy-3-methylglutaric acid in rats on different carbohydrate diets. **Lipids**. Georgia, USA: vol.12, n.3, p. 262-6 1977.
- YOUSUFZAI, S.Y; SIDDIQI, M. Tissue lipid responses to 3-hydroxy-3-methylglutaric acid with different dietary fats. **Lipids**, vol 12, no.3, p.258-61, 1977.
- YOUSUFZAI, S.Y; SIDDIQI, M. 3-hydroxy-3-methylglutaric acid and experimental atherosclerosis in rats. **Experientia**. Georgia, USA: vol. 32, n.8, p.1033-4, 1976 .
- YOUSUFZAI, S.Y ; SIDDIQI, M ; ABDULLAH AK. Protective effects of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid in alcohol-induced lipemia. **Lipids**. Georgia, USA: vol. 11, no. 7, p. 526-9, 1976.
- YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Santa Catarina: Ed Argos, 2001, p.78-91