**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL TERATOGENICO DO EXTRATO
BENZÊNICO DE *HIBISCUS ROSA SINENSIS*, ADMINISTRADO A RATAS**

CLÁUDIA REGINA CLARETO¹
ALDANEI BARBOSA GONÇALVES¹
JOÃO EVANGELISTA DE PAULA REIS²
VERA MARIA PETERS¹
MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA¹

1. Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36101 - Juiz de Fora - MG - Brasil.
2. Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36101 - Juiz de Fora - MG - Brasil.

RESUMO

O trabalho foi realizado com o objetivo de detectar efeito teratogênico de extrato benzênico de *Hibiscus rosa sinensis* em ratos. Administrou-se o extrato na dose de 200 mg/kg peso corporal/via oral, do 1º ao 10º de gestão. Grupos controles receberam goma arábica em volumes e dias equivalentes. Sacrificaram-se as ratas no 21º dia de gestação. Os fetos e placen-

tas foram pesados. Parte dos fetos foram fixados em formol. Posteriormente, os fetos fixados, foram pesados e dissecados para se obter os seguintes órgãos: rins, fígado, pulmão, encéfalo, ponte e cerebelo.

Não se observaram efeito inibidor da fertilidade, alterações nos pesos corporais ou de órgãos de fetos e nem malformações, no grupo de animais tratados com extrato benzênico de flores de *Hibiscus rosa sinensis*, cultivadas no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. A ausência do efeito inibidor da fertilidade deste extrato, possivelmente, decorre das condições climáticas e do solo, que podem alterar a composição química da planta.

UNITERMOS: *Hibiscus rosa sinensis*, teratologia, rato.

ABSTRACT

PRELIMINAR EVALUATION OF TERATOGENIC POTENTIALITY OF *HIBISCUS ROSA SINENSIS* BENZENIC EXTRACT IN RATS

In order to test the teratogenic effect benzenic extract of *Hibiscus rosa sinensis* flowers, 200 mg/kg body weight of extract was given to female rats from the 1st to the 10th day of pregnancy. The fetal body and organs (kidney, lung, liver, brain, pons and cerebellum) weights were recorded.

No weight changes or gross malformations were observed in the treated group of fetuses suggesting that benzenic extract from flowers cultivated in Juiz de Fora, MG, was not teratogenic to rats. The antifertility effect has not been observed, possibly because of different soil and climatic conditions of the geographic region, that may alter the chemical composition of the plant.

KEY WORDS: *Hibiscus rosa sinensis*, teratology, rat.

Introdução

Hibiscus rosa sinensis é uma planta ornamental, cultivada na Índia e em várias outras regiões geográficas, inclusive o Brasil. O folclore popular e a literatura Ayurvedica antiga, na Índia, atribuem às flores daquela planta, atividade contra-

POTENCIAL TERATOGÊNICO DO *HIBISCUS*

ceptiva (Kholkute e Udupa, 1976).

Estudos experimentais realizados em ratas mostraram que extratos alcoólicos, aquosos e benzênicos das flores de *Hibiscus rosa sinensis*, administrados do 1º ao 11º dias de gravidez, apresentavam atividade inibidora da fertilidade. O extrato mais efetivo foi o benzênico, na dose de 200 mg/kg de peso corporal (Balta e Santhakumari, 1971; Kholkute et al., 1976; Kholkute e Udupa, 1976; Singh et al., 1982).

Tais trabalhos, aliados à informação folclórica do uso da planta por seres humanos, indicam, para ela, um elevado potencial para futura utilização como contraceptivo humano. Entretanto, no trabalho em que se encontram referências à observação das crias de ratas tratadas com extrato de *Hibiscus rosa sinensis*, os autores comentam, apenas que os recém-nascidos mostram aspecto normal (Kholkute e Udupa, 1976). Falta, portanto, uma avaliação do potencial teratogênico do extrato de *Hibiscus rosa sinensis*.

No presente trabalho pretende-se iniciar a avaliação do potencial teratogênico do extrato benzênico de *Hibiscus rosa sinensis*, administrado às ratas.

Material e Métodos

Preparação do extrato

Flores frescas de *Hibiscus rosa sinensis* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG e, depois de secas e reduzidas a pó, foram extraídas com benzeno, conforme a técnica descrita por (Kholhute et al., 1976; Singh et al., 1982).

Todo o processo de preparação do extrato benzênico de *Hibiscus rosa sinensis* (EBH), assim como sua diluição em solvente compatível (goma arábica), foi executado no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Ensaio biológico

Ratas Wistar, adultas (3 meses), virgens, obtidas da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução, foram inseminadas por machos de fertilidade comprovada. A presença de espermatozoides, no esfregaço vaginal, indicou o 19 dia de gestação.

Os animais inseminados foram divididos em um lote controle de 12 animais, e outro tratado de 10 animais. O grupo tratado recebeu, por via gástrica, 200 mg/kg peso corporal de EBH, desde o 19 até o 109 dia de gestação. Os animais do grupo controle receberam o diluente do extrato (goma arábica), em volume equivalente e pela mesma via que os do grupo tratado.

No 219 dia de gestação, todos os grupos foram sacrificados (deslocamento cervical) e, através de laparotomia materna, os cornos uterinos foram expostos, seccionados longitudinalmente, contando-se os fetos vivos e os mortos. Fetos que se moviam, espontaneamente ou pelo toque com a pinça, foram considerados vivos. Os fetos vivos e suas respectivas placentas, foram removidos do útero, pesados em balança de precisão e examinados externamente, para identificação de malformações. Vinte e três fetos do grupo controle e 28 do grupo tratado foram sacrificados após crioanestesia e fixados em formol a 10%, por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, foram pesados e, em seguida, procedeu-se ao exame macroscópico e pesagem dos seguintes órgãos: rim, fígado, pulmão, encéfalo e o conjunto ponte e cerebelo. Os pesos dos órgãos foram correlacionados ao peso corporal, de modo a se obter o peso relativo (mg do órgão/100 mg de peso corporal fetal) conforme descrito por Solomon e Bengele (1973).

Os resultados foram analisados pelo teste "t" de Student e Qui quadrado (Snedecor e Cochran, 1967).

POTENCIAL TERATOGÊNICO DO *HIBISCUS*

Resultados

Foram obtidos 103 fetos de ratas controles e 88 de ratas tratadas com EBH. As médias de fetos vivos por rata grávida foram, respectivamente, $8,5 \pm 1,7$ (12) e $8,8 \pm 1,7$ (10), não havendo diferença significativa entre os grupos. Ocorreram 9,6% de mortes embrionárias no grupo controle e 12,5% no tratado, não havendo diferença na incidência de mortes, entre os dois grupos.

Os pesos de fetos e placentas nos dois grupos não diferiram, como pode ser verificado na tabela 1.

TABELA 1

Peso de fetos e placentas obtidas de ratas aos 21 dias de gestação controles e tratados com EBH (200 mg/kg de peso corporal).

GRUPOS	PESO (g)*	
	FETOS	PLACENTAS
Controles	$3,67 \pm 0,36$ (103)	$0,61 \pm 0,09$ (102)
Tratado	$3,74 \pm 0,45$ (88)	$0,58 \pm 0,06$ (88)

*Resultado expresso em média $\pm$ desvio padrão.
() Número de casos estudados.

O processo de fixação em formol a 10% reduziu ($\alpha < 0,01$) o peso corporal em 2,12% (grupo controle) e 3,5% (grupo tratado).

Nos animais a fixação em formol a 10%, os pesos corporais, de rins, de fígados, de pulmões, de ponte e cerebelo e de encéfalo, não se alteraram com o tratamento, quando comparados aos controles (tabela 2).

TABELA 2

Peso corporal e peso absoluto de órgãos fetais, após fixação em formol a 10%, nos grupos controle (goma arábica) e tratado (EBH - 200 mg/kg peso corporal).

PARÂMETROS	PESO	
	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO
Feto (g)	3,75 ± 0,37 (23)	3,69 ± 0,51 (28)
Rins (mg)**	39,56 ± 11,86 (23)	41,60 ± 15,73 (25)
Fígado (mg)	335,22 ± 52,73 (23)	341,11 ± 70,73 (27)
Pulmão (mg)	114,34 ± 16,47 (23)	118,10 ± 26,53 (26)
Ponte + cerebelo (mg)	70,95 ± 11,79 (21)	67,78 ± 12,19 (27)
Encéfalo (mg)	112,86 ± 15,54 (21)	117,78 ± 21,9 (27)

*Média ± desvio padrão.

() Número de casos estudados.

**Peso do par de rins.

Mesmo após a correção do peso do órgão, em função do peso corporal, nota-se que o peso dos órgãos fetais do grupo de mães tratadas foi semelhante aos encontrados em fetos de mães controles (tabela 3).

Não foram observadas malformações macroscópicas externas e nem nas vísceras examinadas.

POTENCIAL TERATOGÊNICO DO *HIBISCUS*

TABELA 3

Peso relativo (g/g) de órgãos obtidos de fetos aos 21 dias, em ratas submetidas a tratamento com goma arábica (controle) ou EBH 200 mg/kg de peso corporal (grupo tratado).

ÓRGÃOS	PESO*	
	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO
Rins (par)	1,062 ± 0,321 (23)	1,096 ± 0,403 (25)
Fígado	8,904 ± 0,703 (23)	9,028 ± 1,149 (27)
Pulmão	3,061 ± 0,414 (23)	3,055 ± 0,603 (26)
Ponte + cerebelo	1,885 ± 0,283 (23)	1,836 ± 0,415 (27)
Encéfalo	3,019 ± 0,471 (21)	3,161 ± 0,594 (27)

*Média ± desvio padrão.
() Número de casos estudados.

Discussão e Conclusões

Contrariamente ao que se encontra na literatura (Kholkute et al., 1976; Kholkute e Udupa, 1976; Singh et al., 1982; Kabir et al., 1984; Pal et al., 1985; Pakrashi et al., 1986) o tratamento com extrato benzênico de *Hibiscus rosa sinensis*, realizado com plantas coletadas no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, não apresentou efeito abortivo.

A discrepância de resultados parece não ser devida à metodologia da preparação do extrato benzênico uma vez que foi empregada a mesma descrita por Kholkute e Udupa (1976). Além disso, o extrato foi o que demonstrou maior atividade inibidora da fertilidade na dose de 200 mg/kg de peso corporal (80% de interrupção do desenvolvimento embrionário - Singh et al., 1982). O período de gestação em que o extrato foi administrado correspondeu ao mesmo de outros trabalhos (Kholkute et al., 1976; Kholkute e Udupa, 1976; Singh et al., 1982). Pode-se portanto, baseado nestes resultados, descartar a possibilidade de problemas quanto ao tipo de extrato, dose e período de gestação

em que a droga foi administrada.

Os autores acima mencionados, usaram óleo de oliva e goma de acácia como veículo para o extrato. No presente trabalho foi usada a goma arábica, porém não parece provável que tal solvente possa ter alterado o extrato pois, foram tomadas todas as precauções quanto a pureza e qualidade do produto, preparando-o adequadamente para o ensino biológico.

Conforme já foi relatado por Rizzini e Mors (1975), pode ocorrer alterações na composição química de uma planta, de acordo com o clima e o solo onde ela é cultivada. Assim, é possível que o *Hibiscus rosa sinensis*, cultivado em Juiz de Fora, tenha composição química diferente daquele cultivado na Índia. Esta parece ser a hipótese mais provável para explicar os resultados obtidos no presente trabalho, comparados àqueles encontrados na literatura. Apesar de controversia dos resultados, trata-se de um dado importante pois é comum generalizar-se que determinada espécie tem atividade inibidora da fertilidade sem levar em conta sua procedência. Talvez seja necessário, ao lado das tabelas que indicam espécies com potencial inibidor da fertilidade, acrescentar o local de onde as plantas foram obtidas.

Pretendeu-se avaliar o potencial teratogênico do EBH, administrado a ratas, pois, segundo Tuchmann-Duplessis (1974), se um número grande de animais de diferentes espécies, tratados com a substância que se deseja avaliar, não exhibe malformações congênitas nem taxa de reabsorção embrionária elevadas, pode ser considerada como sendo, potencialmente não teratogênica para a espécie humana. No caso do extrato de EBH, a taxa de mortes embrionárias não foi alterada pelo tratamento e não foram encontradas malformações anatômicas significativas.

Rim, fígado, pulmão e cérebro, são órgãos vitais para o desenvolvimento normal da cria. Alterações no seu desenvolvimento, que sejam detectáveis por redução do peso, indicam a provável incapacidade de sobrevivência dos recém-nascidos. Neste trabalho pode-se afirmar que o peso daqueles órgãos não so-

POTENCIAL TERATOGÊNICO DO *HIBISCUS*

freu redução devido ao tratamento materno com o extrato de EBH.

Como a dissecação e pesagem dos órgãos é demorada, e haviam muitos animais a serem dissecados, optou-se por fixar 1 e 2 fetos por mãe, e realizar depois, a dissecação com mais precisão. Durante o processo de fixação ocorre uma série de alterações tissulares como por exemplo, a coagulação de proteínas e em consequência o peso de fetos e seus órgãos pode sofrer alteração. Por isso os fetos foram pesados antes da remoção dos órgãos e obteve-se o peso relativo do órgão, em função do peso corporal. Com tais cuidados, foram obtidos dados que permitiram maior segurança na avaliação dos dados coletados. De fato, o peso corporal dos fetos sofreu uma redução de 2 a 3,5% em relação aos fetos pesados a fresco. Tal diferença foi significativa a nível de alfa < 0.01 . Porém, efetuando-se a correção dos pesos dos órgãos tem-se uma medida bastante confiável do efeito da administração do extrato. O que se pode verificar foi que mães tratadas com EBH tinham fetos com peso corporal e de órgãos vitais (pulmão, fígado, rins e cérebro) semelhantes aos do grupo controle. Também não foram observadas malformações anômicas nos órgãos fetais de um ou outro grupo. Portanto, o extrato não teve efeito lesivo observável macroscopicamente, nos fetos.

Em conclusão, pode-se dizer que o extrato benzênico de flores de *Hibiscus rosa sinensis*, coletadas em Juiz de Fora, não exibiu efeito inibidor da fertilidade em ratas e também não apresentou efeito teratogênico. No entanto, não é possível afirmar que o mesmo extrato, obtido de flores cultivadas na Índia, também seja desprovido de potencial teratogênico.

Agradecimentos

Os autores agradecem a assistência técnica dos Srs. Paulo Sérgio do Carmo e Humberto José Deotti e ao Special Programme of Research, Development and Research Training on Human Reproduction - WHO.

Referências Bibliográficas

- Batta, S.K. e Santhakumari, G. (1971). The antifertility activity of *Ocimum sanctum*. **Indian J. Med. Res.**, **59**:777-781.
- Kabir, S.N.; Bhattacharya, K.; Pal, A.K. e Pakrashi, A. (1984). Flowers of *Hibiscus rosa sinensis*, a potential source of contragestative agent. I. Effect of benze extract on implantation of mouse. **Contraception**, **29**(4):385-397.
- Kholkute, S.D.; Mudgal, V. e Desphane, P.J. (1976). Screening of indigenous medicinal plants for anti-fertility potentiality. **Planta Medica**, **29**(2):151-155.
- Kholkute, S.D. e Udupa, K.N. (1976). Effects of *Hibiscus rosa sinensis* on pregnancy of rats. **Planta Medica**, **29**(4):321-329.
- Pakrashi, A.; Bhattacharya, K.; Kabir, S.N. e Pal, A.K. (1986). Flowers of *Hibiscus rosa sinensis*, a potential source of contragestative agent. III. Interceptive effect of benzene extract in mouse. **Contraception**, **34**(5):523-536.
- Pal, A.K.; Bhattacharya, K.; Kabir, S.N. (1985). Flowers of *Hibiscus rosa sinensis*, a potential source of contragestive agent. III. Possible mode of action with reference to anti-implantation effect of the benzene extract. **Contraception**, **32**(5):517-527.
- Singh, M.P.; Singh, R.H. and Udupa, K.N. (1982). Anti-fertility of a benzene extract of *Hibiscus rosa sinensis* flower on female albino rats. **Planta Medica**, **44**:171-174.
- Snedecor, G.W. e Cochran, W.G. (1967). **Statistical methods**. 6.ed. Ames. The Iowa State University Press, 593p.
- Solomon, S. e Bengele, H.H. (1973). Growth rates and organis weight of rats. **Biol. neonate**, **22**:222-229.
- Tuchmann-Duplessis, H. (1974). Méthodes expérimentales pour la detection des agents teratogènes. **Biol. Med.**, **3**(2):91-167.