

POTENCIAL ABORTIVO DE *Tillandsia usneoides* L. (BARBA-DE-PAU) EM COELHAS GESTANTES – NOTA PRÉVIA

Sheyla Noya Fracaro
Tomoe Nakashima
Ivan Deconto

FRACARO¹, S.N.; NAKASHIMA², T.; DECONTO³, I. Potencial abortivo de *Tillandsia usneoides* L. (barba-de-pau) em coelhas gestantes – Nota prévia. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 7(2): p. 181-185, 2004.

RESUMO: *Tillandsia usneoides* L., também conhecida como barba-de-pau ou barba-de-velho, é uma Bromeliaceae presente em grande parte do território brasileiro, e em áreas úmidas desde o sudoeste dos EUA até o Chile e centro da Argentina. Relatos de criadores de animais relacionam essa planta à ocorrência de abortos em éguas e vacas. Os objetivos deste trabalho foram a análise fitoquímica de partes totais de *Tillandsia usneoides* e a avaliação preliminar do potencial abortivo de seu extrato hidroalcoólico em coelhas. Na análise fitoquímica observou-se a presença de flavonóides, esteróides, antraquinonas, cumarinas, micotoxinas, antocianinas, saponinas, taninos e aminogrupos. Os resultados da administração do extrato hidroalcoólico liofilizado a coelhas gestantes foram inconclusivos, em função da ocorrência de pseudogestação e da alta variação do número de filhotes nascidos dentro dos grupos de estudo.

PALAVRAS-CHAVE: *Tillandsia usneoides*, barba-de-pau, coelho, aborto, fitoquímica

ABORTIVE POTENTIAL OF *Tillandsia usneoides* L. IN PREGNANT RABBITS – PRELIMINARY REPORT

FRACARO, S.N.; NAKASHIMA, T.; DECONTO, I. Abortive potential of *Tillandsia usneoides* L. in pregnant rabbits – Preliminary report. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 7(2): p. 181-185, 2004.

ABSTRACT: *Tillandsia usneoides* L., also known as Spanish moss, is a Bromeliaceae present to 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 abortive potential of its hydroalcoholic extract in female rabbits. The phytochemical analysis showed flavonoids, steroids, antraquinones, coumarins, micotoxins, antocyanins, saponins, tannins, and aminogroups. The results of administration of the lyophilized hydroalcoholic 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, abortion, phytochemistry

POTENCIAL ABORTIVO DE *Tillandsia usneoides* L. EN CONEJAS GESTANTES – RELATO PRELIMINAR

FRACARO, S.N.; NAKASHIMA, T.; DECONTO, I. Potencial abortivo de *Tillandsia usneoides* L. en conejas gestantes – Relato preliminar. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 7(2): p. 181-185, 2004.

RESUMEN: *Tillandsia usneoides* L. es una Bromeliaceae presente en gran parte del territorio brasileño, y en áreas húmedas del sudeste de los EUA hasta Chile y centro de Argentina. Granjeros mencionan una relación de esta planta con la ocurrencia de abortos en yeguas y vacas. Los objetivos de este estudio fueron el análisis fitoquímico de partes totales de *Tillandsia usneoides* y la evaluación del potencial abortivo de su extracto hidroalcohólico en conejas. En el análisis fitoquímico se observaron flavonoides, esteroides, antraquinonas, cumarinas, micotoxinas, antocianinas, saponinas, taninos y aminogrupos. Los resultados de la administración del extracto hidroalcohólico liofilizado a conejas preñes no fueron conclusivos debido a la ocurrencia de pseudopreñez y a la alta variación en el número de conejitos nacidos dentro de los grupos estudiados.

PALABRAS-CLAVE: *Tillandsia usneoides*, coneja, aborto, fitoquímica

¹ Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba – PR. sheylafracaro@bol.com.br

² Professora Doutora do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas do Setor de Ciências da Saúde da UFPR. tomoenakashima@ufpr.br

³ Professor Doutor do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias do Setor de Ciências Agrárias da UFPR, Curitiba – PR. deconto@ufpr.br

Introdução

Tillandsia usneoides L. é uma Bromeliaceae presente em grande parte do território nacional, estando presente em todas as regiões e 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 fragmentos são carregados pelo vento, se fixam em outros galhos e crescem. A aparência peculiar e sua forma de fixação a galhos de árvores deram-lhe os nomes populares de barba-de-pau ou barba-de-velho. Sua ampla distribuição geográfica faz com que esta planta esteja presente em praticamente toda a região neotropical (ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2004). Com isso, torna-se comum sua presença em pastagens, com fácil acesso de animais aos ramos da planta.

Existem observações populares que relacionam a ingestão da planta com a ocorrência de abortos e problemas reprodutivos, sem causas definidas, em éguas e vacas gestantes mantidas em pastagens com acesso a *Tillandsia usneoides*. Assim, justificam-se estudos a respeito das propriedades toxicológicas e abortivas da planta.

Material e Métodos

Utilizou-se neste estudo a planta inteira, colhida em Campo Largo, Região metropolitana de Curitiba – Paraná, em abril de 2003 (uma exsiccata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal do Paraná, sob número 45101).

Para a determinação dos metabólitos secundários foram realizados testes segundo os métodos empregados por NAKASHIMA (1993). Foram preparados extratos hidroalcoólicos das amostras recebidas para as análises dos metabólitos ativos, através de maceração da planta total por 15, dias em solução hidroalcoólica 70:30 (v/v). A partir do extrato hidroalcoólico bruto procedeu-se a extração sucessiva em funil de separação com n-hexano (fração 1), éter etílico (fração 2), clorofórmio (fração 3), acetato de etila (fração 4) e butanol (fração 5). No extrato residual (fração 6) acrescentou-se etanol a 70% até o volume de 200 ml.

Foram realizadas análises organolépticas (cor, sabor, odor), determinação de pH e determinação do extrato seco das frações do extrato hidroalcoólico de *Tillandsia usneoides*. A seguir, pesquisaram-se alcalóides (por meio dos reativos gerais de Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand), glicosídeos flavônicos (por meio da reação de Shinoda ou da cianidina) e, posteriormente, a reação oxalo-bórica, em que as soluções etéreas foram examinadas sob luz ultra-violeta (UV) (366 nm).

Para a pesquisa de esteróides ou triterpenos, efetuou-se a reação de Lieberman – Bouchardat, e para a pesquisa de glicosídeos antraquinônicos, efetuou-se a reação de Bornträgger. Para a pesquisa de cumarinas, verificou-se o desenvolvimento de fluorescência azul ou verde do extrato etéreo, com NaOH 0,1N sob luz UV (366 nm).

Para pesquisa de micotoxinas, realizou-se a extração de micotoxinas de sementes de milho e amendoim mofados, usadas como substância de comparação. Cinco gramas de sementes moídas foram adicionadas a 20 ml de clorofórmio, e submetidas a agitação por 30 minutos, procedendo-se a seguir cromatografia em camada delgada. Foi empregada a fase móvel CHCl_3 :MetOH (98:2) e, como revelador, a solução de H_2SO_4 a 20% em metanol, observando-se sob luz UV (366 nm). Os resultados obtidos foram comparados com a cromatografia das frações n-hexano e extrato hidroalcoólico de *T. usneoides* obtidas anteriormente.

A pesquisa de aminogrupos foi realizada em placa de cromatografia em camada delgada, empregando o reativo de ninhidrina.

No extrato aquoso, preparado por maceração de 40 gramas da planta em 200 ml de água bidestilada por duas horas, em banho-maria, foram executadas análises organolépticas, determinação de pH e determinação de resíduo seco, bem como pesquisa de heterosídeos antocianícos, através da variação do pH do extrato (ácido, alcalino e neutro). Através da formação de espuma persistente após a agitação dos frascos anteriores, definiu-se a presença de heterosídeos sapônicos.

A pesquisa de heterosídeos cianogênicos se deu por meio da reação de Schoembein, e a pesquisa de taninos foi realizada por meio de reação com cloreto férrico, reação com $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$ e reação de formol clorídrico.

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 4 coelhas, sendo 1 de cada grupo, por motivos alheios ao experimento (problemas com ferimentos e sarna otodécica), perfazendo um total de 7 coelhas para cada dose de extrato e 7 controles. Os animais receberam água *ad libitum*, através de bebedouros automáticos individuais. A alimentação consistiu de ração comercial (quantidade controlada de 200 g por coelha, divididos em duas porções, servidas pela manhã e ao fim da tarde) e pasto verde, servido à vontade diariamente, no meio do dia. O dia da cópula foi considerado o dia 0 do experimento. O diagnóstico de gestação foi feito por palpação abdominal no 10º dia, a partir do qual foi administrado o extrato hidroalcoólico liofilizado diluído em água e adicionado à ração da tarde. As coelhas foram divididas em quatro grupos de quatro indivíduos, em cada ensaio: D1, D2, D3 e Controle. As doses utilizadas foram: D1 – 1, 6 g de planta/kg, diluídos em 1,0 ml de água; D2 – 0,8 g de planta/kg, diluídos em 0,5 ml de água; D3 – 3,2 g de planta/kg, diluídos em 2,0 ml de água; Controle – 2,0 ml de água.

Resultados

Os resultados da análise de princípios ativos em extrato hidroalcoólico e extrato aquoso de *Tillandsia usneoides* são apresentados nos Quadros 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1 – Análise de princípios ativos em extrato hidroalcoólico de *Tillandsia usneoides*

Frações	Extrato bruto	n-hexano	Éter etílico	Clorofórmio	Acetato de etila	Butanol	Extrato restante EtOH 70%
Princípios pesquisados							
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

Quadro 2 – Análise de princípios ativos em extrato aquoso de *Tillandsia usneoides*

Princípios pesquisados	Resultados
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

O número de filhotes vivos e natimortos obtidos de coelhas tratadas com extrato hidroalcoólico liofilizado de *Tillandsia usneoides* é apresentado na Tabela 1, enquanto a Tabela 2 apresenta as taxas reprodutivas observadas em coelhas tratadas com o extrato hidroalcoólico liofilizado da planta.

Tabela 1 – Número de filhotes vivos e natimortos obtidos de coelhas tratadas com extrato hidroalcoólico liofilizado de *Tillandsia usneoides*

Doses de tratamento	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

Tabela 2 – Índices reprodutivos observados em coelhas tratadas com extrato hidroalcoólico liofilizado de *Tillandsia usneoides*

Tratamento	DI	D2	D3	Controle
Índices reprodutivos				
Parto (%)	62,5	37,5	75	87,5
Natalidade (%)	67,7	72,72	88,9	95,45
Peso da prole (g)	62,26±11,28	52,24±16,71	55,41±7,34	56,40±5,78

Discussão e Conclusões

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. 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.

SENA (1996) também identificou em análise fitoquímica a presença de taninos, flavonóides, esteróides livres e traços de bases quaternárias, mas seus dados diferem quanto aos resultados observados nos grupos de glicosídeos antociânicos e saponinas, citadas por ele como negativos nos seus experimentos. De acordo com BRUNETON (1991) e BRESOLIN & CECHINEL FILHO (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. CABRERA, GALLO & MENDES (1996) identificaram esteróis de cadeia semelhante ao cicloartano em *Tillandsia usneoides*. A presença de esteróis também foi confirmada neste experimento.

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 no presente estudo.

Comparativamente, as cumarinas presentes no extrato hidroalcoólico e na fração hexânica, quando cromatografadas, 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 sementes de amendoim não foi semelhante à obtida nos extratos da planta. Nas análises laboratoriais realizadas, foram identificados fungos do gênero *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. nas sementes de milho utilizadas para comparação. LLEWELLYN *et al.* (1988) identificaram contaminação natural por *Aspergillus flavus*, *A. niger*, gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Mycellia sterilia* em amostras de *Tillandsia* sp.

Os resultados obtidos no experimento com coelhos em busca de alterações reprodutivas não tiveram significância estatística devido à grande quantidade de coelhas que não demonstraram sinais de parto, 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. Entretanto, 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 têm como hábito comum ingerir os filhotes mortos. Com isso, os sinais de aborto ficam menos evidentes. Como agravante, vários autores (SCADIAN, 1991; PALADINO & PALADINO, 1993; FOOTE & CARNEY, 2000) citam o fenômeno da pseudo-gestação em coelhas, que na verdade vem a ser uma reabsorção fetal, ocorrendo principalmente próximo ao 18º dia de gestação.

A significância estatística também fica prejudicada pela grande variabilidade de filhotes nascidos por coelha, dentro dos grupos do experimento. Em um experimento piloto desenvolvido pela mesma equipe, ainda não publicado, a planta picada foi ministrada a um lote de três éguas, a partir do segundo terço da gestação, na dose de 0,5 g/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 no decorrer de dois anos, em um lote de 11 éguas mantidas em um piquete onde havia *Tillandsia usneoides*, havendo relato da ingestão da planta. Quando as éguas foram retiradas do piquete os abortos cessaram e uma delas, sendo recolocada no piquete, voltou a abortar.

Com isso, verifica-se que para esse modelo experimental, pela dificuldade em se detectar o aborto e pela variabilidade no número de filhotes nascidos por coelha, os testes estatísticos não demonstraram significância. Apesar disso, os resultados obtidos sugerem a ocorrência de alterações reprodutivas devido à ingestão de extrato hidroalcoólico liofilizado de *Tillandsia usneoides* durante a gestação. Sugere-se que novos estudos sejam conduzidos.

Referências

- BRESOLIN, T.M.B. CECHINEL FILHO, V. *Ciências farmacêuticas*, Itajaí: ed. Univali. p.35-37, 2003.
- BRUNETON, J. *Elementos de fitoquímica e farmacognosia*. Espanha: Ed. Acribia. p.107-353, 1991.
- CABRERA, G. M., GALLO, M., SELDES A. M.; Cycloartane derivatives from *Tillandsia usneoides*. In: *Journal of natural products*, Argentina, v.59, p.343-347, 1996.
- CABRERA, G.M., SELDES, A.M.; Short side-chain cycloartanes from *Tillandsia usneoides*. In: *Phytochemistry*. Argentina: Vol. 45, No. 5, pp. 1019-1021, 1997.
- 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*. In: *International Biodeterioration*, v.24, p.167- 174, 1988.
- FOOTE, H; CARNEY, E. W. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. In: *Reproductive Toxicology*, v. 14, p. 477-493, 2000.

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.

PALADINO, A. S. P; PALADINO, S.A.S; *Manual de Cunicultura*, Argentina: 2ª. ed., Ed. Albatroz; p.64-93; 1993.

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*. In: *Anais do XIV Simpósio de plantas Mediciniais do Brasil*, SC: 1996.

SPANISH MOSS. Encyclopaedia Britannica. 2004. Encyclopaedia Britanica Premium service. 2004. Online, <<http://britannica.comn/eb/article?tocId=9068995>> Visitada em: 30/02/2004

WITHERUP KM, MCLAUGHLIN JL, JUDD RL, ZIEGLER MH, MEDON PJ, KELLER WJ. Identification of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) as a hypoglycemic principle of Spanish moss (*Tillandsia usneoides*). In: *Journal of Natural Products*, v.58, n.8, p.1285-90, 1995.

Recebido para publicação em 10/05/2004.

Received for publication on 10 May 2004.

Recibido para publicación en 10/05/2004.

Aceito para publicação em 15/06/2004.

Accepted for publication on 15 June 2004.

Acepto para publicación en 15/06/2004.

