



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR DE SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**ANA MARQUES BOTELHO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GALACTAGOGA DO EXTRATO  
ETANÓLICO DE *Valeriana officinalis* LINN E DA SUA FRAÇÃO  
DICLOROMETANO, EM MODELO EXPERIMENTAL COM RATAS**

Vitória da Conquista, BA

2020

**ANA MARQUES BOTELHO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GALACTAGOGA DO EXTRATO  
ETANÓLICO DE *Valeriana officinalis* LINN E DA SUA FRAÇÃO  
DICLOROMETANO, EM MODELO EXPERIMENTAL COM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biociências, Instituto Multidisciplinar em Saúde,  
Universidade Federal da Bahia, como requisito para a  
obtenção do título de Mestre em Biociências

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Regiane Yatsuda  
Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mariluze Cruz

Vitória da Conquista, BA

2020

B748

Botelho, Ana Marques.

Avaliação da atividade galactagoga do extrato etanólico de *valeriana officinalis* Linn e da sua fração diclorometano, em modelo experimental com ratas. / Ana Marques Botelho. – 2020

86 f.: il.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regiane Yatsuda.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariluze Peixoto Cruz

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Biociências, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2020.

1. Leite Humano. 2. *Valeriana Officinalis* L. 3. Transtornos da lactação. 4. Plantas medicinais. I. Universidade Federal da Bahia. II. Yatsuda, Regiane. III. <sup>a</sup> Cruz, Mariluze Peixoto. IV. Título.

CDU: 613.2

ANA MARQUES BOTELHO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GALACTAGOGA DO EXTRATO  
ETANÓLICO DE *Valeriana officinalis* LINN E DA SUA FRAÇÃO  
DICLOROMETANO, EM MODELO EXPERIMENTAL COM RATAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Bahia e ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências.

Defesa em 18 de dezembro de 2020.

**Banca examinadora**



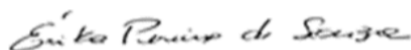
---

**Regiane Yatsuda** – Orientadora  
Doutora em Odontologia pela Universidade Estadual de Campinas  
Docente da Universidade Federal da Bahia



---

**Lucas Miranda Marques** – Membro Convidado  
Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade de São Paulo  
Docente da Universidade Federal da Bahia



---

**Érika Pereira de Souza** – Membro Convidado  
Doutora em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal da Bahia  
Docente da Faculdade Independente do Nordeste (FAINOR)

*Às mães que não medem esforços para amamentar seus bebês*

## AGRADECIMENTOS

Desde o momento em que eu comecei a estudar para a seleção de mestrado, se iniciou um período de muitos desafios e por isso, grande desenvolvimento acadêmico e pessoal. Concluo esta etapa me sentindo bastante fortalecida e com a certeza de que ninguém faz nada sozinho na vida. Dessa forma, apresento meus mais sinceros agradecimentos às pessoas que estiveram ao meu lado durante essa trajetória.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu **Mestre**, estrela que sempre guia meus passos a lugares seguros. Agradeço também à **irmandade do Núcleo Vitória**, pelo acolhimento durante os meus somados 8 anos de graduação e mestrado.

A minha orientadora, **Regiane Yatsuda**, por me conceder a oportunidade de ingressar em uma pós-graduação e pela parceria para a realização dessa dissertação. Igualmente, agradeço à minha co-orientadora **Mariluze Peixoto Cruz**, por todos os ensinamentos e aprendizado.

A minha família, pelo apoio. Em especial aos meus pais, **Marcus e Dorana**, e avós, **Arnon e Lúcia** (*in memorian*). A **Carlos, Amélia** e toda a **Família Meneguitte**, por terem sido minha segunda família durante boa parte dessa trajetória em Vitória da Conquista e feito o meu dia a dia ser tão alegre e acolhedor. À **Caio Mário e Eliana** por também serem minha família e me incentivarem a ser a melhor versão de mim mesma.

A todos os meus **colegas de pós-graduação**, pelo companheirismo, em especial à **Manoela e Lorena**, pelos ensinamentos passados e amizade construída durante o percurso. Agradeço igualmente a todos os alunos de iniciação científica do **Projeto Leite**, pela dedicação que tiveram para que esta pesquisa fosse realizada.

Aos **meus professores**, pela contribuição que deram à minha formação. Agradeço também a todos os **funcionários e técnicos** da Universidade Federal da Bahia, *Campus Anísio Teixeira*, pela competência e boa vontade em auxiliar sempre que necessário.

Aos meus amigos **Dena e Maria**, por terem me apoiado durante a escrita deste trabalho. Ao meu médico **Arnaldo Silva** e à **Dra. Odilza**, por terem cuidado tão bem da minha saúde, sem a qual não teria conseguido chegar até aqui.

Agradeço enfim às Instituições financiadoras: **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos durante quase todo o período de mestrado e à **Fundação de Amparo à Pesquisa e à**

**Inovação Tecnológica do Estado da Bahia (FAPESB)**, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

*“O leite materno é uma fórmula encantada  
desafiando todas as ciências”  
(Luis Alberto Mussa Tavares)*



## RESUMO

O leite materno é um alimento completo e adequado para a grande maioria dos recém-nascidos, apresentando diversos benefícios tanto para a mãe quanto para o bebê. No entanto, algumas mulheres apresentam hipogalactia causada por situações como parto prematuro, re-lactação, disfunções metabólicas e problemas psicológicos relacionados ao estresse. Nesse contexto, alimentos, medicamentos e plantas medicinais com propriedades galactogogas são utilizados para aumentar a produção de leite. Valeriana (*Valeriana officinalis* L.) é uma planta medicinal conhecida por suas propriedades sedativas, sendo por isso comumente utilizada por lactantes como alternativa para tratar estados de ansiedade, comuns durante a amamentação. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade galactogoga do extrato etanólico de *V. officinalis* (EEVO) e do extrato etanólico da sua fração diclorometano (EEFD), em modelo experimental animal. Ratas Wistar lactantes foram tratadas durante 17 dias, por meio de injeção intraperitoneal com 0,2 ml de água destilada, grupo 1, EEVO nas doses 12,5; 25, 50; 100 e 200 mg/Kg ao dia, grupos 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente e EEFD nas doses 25 e 50 mg/kg, grupos 7 e 8, respectivamente. Ganho de peso diário e total da ninhada, estimativa de produção de leite, composição bioquímica do leite, análise histológica das glândulas mamárias (inguinal, torácica e abdominal) e concentração de prolactina e ocitocina sérica, hipofisária e na glândula mamária foram avaliadas. O grupo tratado com EEVO na dose de 50 mg/Kg obteve os melhores resultados para ganho de peso diário (17 %) e total dos filhotes (12 %) ( $p > 0,05$ ). Ainda, apresentou aumento da concentração de proteínas (30,57 %) e triglicérides totais (27,9%) do leite ( $p > 0,05$ ), bem como maiores concentrações de prolactina sérica e na glândula mamária ( $p > 0,05$ ). Não foram observadas diferenças nos níveis de ocitocina ( $p > 0,05$ ). Ainda, foi observado uma diminuição de células epiteliais alveolares em fase de involução (37,8 %) ( $p > 0,05$ ). Portanto, através desses parâmetros, a Valeriana demonstrou um grande potencial para ser utilizado como substância galactogoga. Porém, mais estudos, avaliando os efeitos da Valeriana sobre a produção de leite, devem ser feitos para justificar seu uso seguro por lactantes e para posterior desenvolvimento de um fitoterápico lactogênico.

**Palavras-chave:** Leite materno, ratas Wistar, lactação, Valeriana, hipogalactia.

## ABSTRACT

Breast milk is a complete and suitable food for the vast majority of newborns, presenting several benefits for both mother and baby. However, some women have hypogalactia caused by situations such as premature birth, re-lactation, metabolic disorders and psychological problems related to stress. In this context, foods, medicines and medicinal plants with galactagogue properties are used to increase milk production. Valeriana (*Valeriana officinalis* L.) is a medicinal plant known for its sedative properties, which is why it is commonly used by lactating women as an alternative to treat anxiety states, common during breastfeeding. The objective of the present study was to evaluate the galactagogue activity of the ethanolic extract of *V. officinalis* (EEVO) and the ethanolic extract of its dichloromethane fraction (FD), in an experimental animal model. During 17 days, lactating Wistar rats were treated during by means of intraperitoneal injection with 0.2 ml of distilled water, group 1, EEVO in doses 12.5; 25, 50; 100 and 200 mg/kg per day, groups 2, 3, 4, 5 and 6, respectively and FD at doses 25 and 50 mg/kg, groups 7 and 8, respectively. Daily and total weight gain of the litter, estimate of milk production, biochemical composition of the milk, histological analysis of the mammary glands (inguinal, thoracic and abdominal) and serum, pituitary and prolactin concentration in the mammary gland were evaluated. The group treated with EEVO at a dose of 50 mg/kg obtained the best results for daily weight gain (17 %) and total pups (12%) ( $p > 0.05$ ). It also showed an increase in the concentration of proteins (30.57 %) and total triglycerides (27.9%) in milk ( $p > 0.05$ ), as well as higher concentrations of serum prolactin and in the mammary gland ( $p > 0.05$ ). There were no differences in oxytocin levels ( $p > 0.05$ ). In addition, a decrease in alveolar epithelial cells in the involution phase was observed (37.8%) ( $p > 0.05$ ). Therefore, through these parameters, Valerian has demonstrated a great potential to be used as a galactagogue substance. However, further studies, evaluating the effects of valerian on milk production, should be done to justify its safe use by lactating women and for the further development of a lactogenic herbal medicine.

**Keywords:** Breast milk, Wistar mouse, lactation, Valeriana, hypogalactia.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
1.1 IMPORTÂNCIA DO ALEITAMENTO MATERNO .....	15
1.2 MORFOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA .....	16
1.3 FISIOLOGIA DA LACTAÇÃO .....	18
<b>1.3.1 Mamogênese na gestação e lactação</b> .....	18
<b>1.3.2 Lactogênese</b> .....	19
<b>1.3.3 Involução</b> .....	21
1.4 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO LEITE MATERNO .....	23
1.5 SUBSTÂNCIAS GALACTAGOGAS .....	24
1.6 <i>Valeriana officinalis</i> L. ....	26
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	29
3.1 OBJETIVO GERAL .....	29
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	29
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	30
4.1 PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS .....	30
4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....	30
4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	31
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ANIMAL .....	32
4.5 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA, PERDA DE PESO DA MÃE E OUTROS PARÂMETROS DA ATIVIDADE GALACTAGOGA .....	33
4.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO LEITE .....	35
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS GLÂNDULAS MAMÁRIAS .....	38

4.8 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROLACTINA E OCITOCINA SÉRICA, HIPOFISÁRIA E DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	39
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>41</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>72</b>
<b>ANEXO A – Reveladores para CCD</b> .....	<b>84</b>
<b>ANEXO B – Comitê de ética</b> .....	<b>85</b>
<b>ANEXO C – Avaliação comportamento da rata</b> .....	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aleitamento materno fornecido exclusivamente até os seis meses de idade e continuado por até dois anos ou mais, juntamente com a inserção gradual da alimentação complementar, é uma das práticas mais eficazes para promover a saúde e o bem-estar da criança. Esse tipo de nutrição oferece diversos benefícios de curto e longo prazo tanto para o bebê, quanto para a lactante (DEL CIAMPO, 2018; UNICEF, 2018), sendo por isso uma intervenção econômica e eficaz para combater a mortalidade infantil e diversas doenças (ROLLINS et al., 2016).

Como barreira aos benefícios da amamentação, a taxa mundial de desmame precoce é alta, sendo que apenas 37% das crianças menores de 6 meses de idade são alimentadas exclusivamente com leite materno (VICTORA et al., 2016). Esse dado demonstra haver ainda um longo percurso para se atingir a meta estabelecida pela OMS (2014) de alcançar, até 2025, a prevalência de pelo menos 50% de aleitamento materno exclusivo no primeiro semestre de vida de crianças de todo o mundo.

A hipogalactia, baixa produção de leite materno, é frequentemente citada por mães lactantes como principal razão para o desmame precoce, em diversas populações (BAZZANO et al., 2017). As razões para essa produção insuficiente vão desde situações emocionais de ansiedade e estresse, parto prematuro e separação mãe-bebê (ASZTALOS, 2018), até disfunções endócrinas como hipotireoidismo, obesidade, diabetes e síndrome do ovário policístico (WAGNER et al., 2018).

Nesse contexto, galactagogos são plantas medicinais, medicamentos ou alimentos utilizados para facilitar a iniciação, manutenção ou aumento da produção de leite, tanto em mulheres, quanto em animais leiteiros (BRODRIBB, 2018; MOHANTY et al., 2014). A maior parte dessas substâncias agem sobre o complexo hormonal que regula a lactação, principalmente sobre a prolactina e a ocitocina de forma a regular a produção de leite (GRZESKOWIAK; WLODEK; GEDDES, 2019).

Feno-grego (*Trigonella foenicum-graecum*), cardo santo (*Cnicus benedictus*), funcho (*Foeniculum vulgare*), arruda de cabra (*Galega officinalis*), são exemplos de ervas utilizadas empiricamente como galactagogas que demonstraram resultados favoráveis à lactação, também do ponto de vista científico (SIM et al., 2015). Apesar disso, mais ensaios clínicos de qualidade devem continuar sendo realizados para verificar a eficácia e a segurança do uso

tradicional dessas plantas, bem como para descobrir novas alternativas de apoio à lactação (BAZZANO et al., 2017).

Valeriana (*Valeriana officinalis* L.) é uma planta pertencente à família Valerianaceae, comumente cultivada na Europa devido a seus efeitos sedativos e calmantes (SEIDLER-LOZYKOWSKA; MIELCAREK; BARANIAK, 2009). Esse efeito sedativo é considerado leve e por isso essa planta é utilizada por lactantes para tratar distúrbios do sono, comuns durante a amamentação, substituindo fármacos como os benzodiazepínicos (ALLAIRE; MOOS; WELLS, 2000; CHRISTIAN et al., 2019; JACOBSON, 2004).

O stress é fator inibitório da liberação de ocitocina pela neurohipófise, o que causa diminuição na produção de leite (COX et al., 2015a; WINTER; JUREK, 2019). Dessa forma, a valeriana pode evitar a desregulação da fisiologia da lactação através de seu efeito sedativo. Apesar de ser comumente utilizada por mulheres lactantes, não existem estudos avaliando sua atividade galactagoga. Ainda, estudos que avaliam os potenciais efeitos toxicológicos da sua administração durante a lactação ainda são escassos, não havendo dados consistentes sobre seu uso seguro durante esse período. (CARVALHO, 2018; CHAVES; LAMOUNIER; CÉSAR, 2007; NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (US), 2006).

Diante deste contexto, a atividade galactagoga do extrato etanólico de *V. officinalis* (EEVO) e da sua fração diclorometano (FD) foi avaliada quanto aos possíveis efeitos favoráveis à lactação decorrentes de sua conhecida atividade sedativa, bem como possíveis compostos bioativos que possam favorecer a lactação agindo de forma direta sobre o eixo hipotálamo-hipofisário, em modelo experimental animal.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 IMPORTÂNCIA DO ALEITAMENTO MATERNO

O leite materno é um alimento completo e adequado para alimentar os recém nascidos, sendo seu uso recomendado de forma exclusiva até os 6 meses de idade e, até os dois anos juntamente com a inserção gradual da alimentação complementar (UNICEF, 2018). A amamentação proporciona amplos benefícios tanto para o bebê quanto para a mãe, a curto e a longo prazo, sendo uma intervenção econômica e eficaz para combater a mortalidade infantil e diversas doenças (ROLLINS et al., 2016).

A riqueza nutricional do leite materno advém principalmente das proteínas, lipídeos e carboidratos, componentes necessários para o crescimento estrutural, reparação tecidual e suporte calórico da criança (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015). Além de fornecer todos os componentes necessários para a nutrição do lactente, o leite materno também o protege contra doenças infecciosas durante os primeiros dois anos de idade, quando seu sistema imunológico ainda é imaturo (CACHO; LAWRENCE, 2017).

Essa proteção se deve, em parte, à presença de lactobacilos e bifidobactérias no leite (probióticos), constituintes da microbiota intestinal que agem como barreira mucosa, impedindo que bactérias patogênicas se fixem na parede do intestino (HO et al., 2018). Além disso, o leite também fornece vários tipos de oligossacarídeos e glicoconjugados conhecidos como agentes prebióticos. Essas substâncias servem de substrato para o metabolismo das bactérias benéficas, sendo mais um estímulo positivo para a colonização intestinal protetora (BERING, 2018).

Outro componente presente no leite que protege o recém-nascido contra infecções é a lactoferrina, proteína mais abundante na fração do soro do leite humano, pertencente à família das proteínas transferrina (LIAO et al., 2011). Esta glicoproteína reforça os mecanismos de defesa do neonato através da modulação do sistema imunológico inato e adaptativo, do estímulo para o desenvolvimento de uma microbiota benéfica e da sua capacidade de se ligar a estruturas moleculares associadas a patógenos (TELANG, 2018).

O leite materno também possui componentes imunológicos: as imunoglobulinas (HURLEY; THEIL, 2011) e as citocinas pró inflamatórias, tais como IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , e IFN $\gamma$  e anti-inflamatórias, tais como IL-10 e TGF- $\beta$  (GAROFALO, 2010). Estas moléculas apresentam um importante potencial imunomodulador agindo, por um lado, como neutralizadores de efeitos patogênicos prejudiciais e, por outro, como indutores da

maturação e desenvolvimento do sistema imunológico da criança (BRENMOEHL et al., 2018).

A presença de imunoglobulinas e citocinas no leite é uma forma de transferência da imunidade adaptativa da mãe para o bebê, protegendo-o contra patógenos até que seu sistema imune produza níveis séricos suficientes desses anticorpos (HENNET; BORSIG, 2016). Dessa forma, a imunização materna realizada através da vacinação ou do próprio contato da mãe com um antígeno também previne o recém-nascido contra infecções, dentro de um mecanismo de imunização passiva, proporcionado pela amamentação (CACHO; LAWRENCE, 2017; MUNOZ; JAMIESON, 2019).

O aleitamento materno tem se mostrado um fator protetor a longo prazo contra o aparecimento de algumas doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade, hipertensão, dislipidemias, doença cardiovascular, diabetes melitus tipo 2, asma e alguns tipos de câncer (BINNS; LEE; LOW, 2016; ODDY, 2017). Ainda, sua prática estimula o desenvolvimento saudável do sistema nervoso, estando associado a um desempenho superior em testes de inteligência entre crianças e adolescentes de todo o mundo (UNICEF; WHO, 2016).

A amamentação também proporciona benefícios para as mães, a curto e a longo prazo, protegendo as mulheres contra hemorragia, depressão pós-parto, câncer de ovário e de mama, doenças cardíacas e diabetes tipo 2 (CHOWDHURY et al., 2015). Dessa forma, estima-se que a melhoria das taxas de amamentação em todo o mundo possa prevenir até 20.000 mortes maternas adicionais por câncer de mama em um ano (VICTORA et al., 2016). Somado a esses pontos, o aleitamento materno ainda reduz significativamente o estresse fisiológico e subjetivo das mães, melhorando a sensibilidade e os cuidados com seus filhos. Esses fatores psicológicos parecem estar estreitamente relacionados à ação da ocitocina sobre o comportamento materno (KROL; GROSSMANN, 2018).

## 1.2 MORFOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

As mamas são estruturas constituídas por tecido adiposo, conjuntivo e glandular, além de vasos sanguíneos e linfáticos e fibras nervosas, tendo como função a produção de leite para nutrição dos filhotes de mamíferos (INMAN et al., 2015). A partir da gravidez, os alvéolos, unidades funcionais da glândula mamária, são desenvolvidos e permanecem presentes durante toda a lactação, até que ocorra o desmame e estas estruturas entrem em involução (MACIAS; HINCK, 2012).

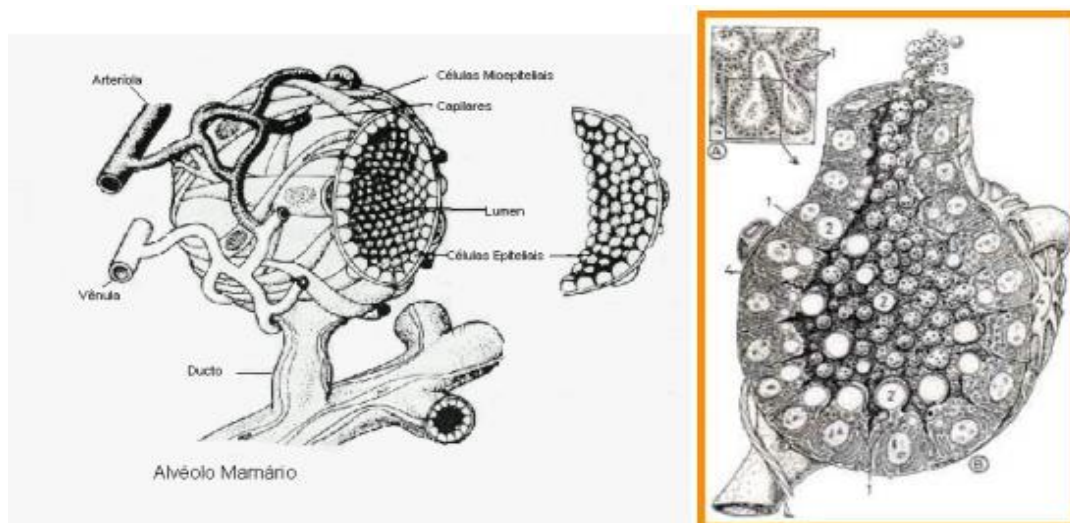


Os alvéolos são responsáveis pela síntese e secreção do leite. Um conjunto de alvéolos forma os lóbulos e um conjunto destes é organizado em lobos. Os alvéolos drenam o leite para os ductulos, que se unem entre si formando ductos maiores que vão desembocar no seio lactífero, onde o leite fica armazenado até que se inicie a mamada. Através da sucção do filhote, o leite sai do seio lactífero através dos ductos lactíferos e se exterioriza para fora da mama através das papilas mamárias (INMAN et al., 2015).

O tecido mamário é dividido em dois compartimentos: o estroma e o epitelial (parênquima). O estroma é composto pelo tecido conjuntivo, constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibras de músculo liso, linfonodos e tecido adiposo (MACIAS; HINCK, 2012). Nesse compartimento pode ocorrer a migração de leucócitos como macrófagos, eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos, células de defesa do organismo (GOUON-EVANS; LIN; POLLARD, 2002).

O parênquima mamário (compartimento epitelial) é composto por duas estruturas distintas do ponto de vista morfofuncional. Apresenta uma camada interna de células epiteliais que recobrem os ductos, ductulos, alvéolos e uma camada externa mioepitelial que os circunda (MACIAS; HINCK, 2012). A função das células epiteliais é a síntese e secreção de leite que acontece, através da sua superfície apical, para dentro do lúmen alveolar. As células mioepiteliais promovem a extrusão desse leite para o sistema de ductos, através de sua contração, via sinalização hormonal (INMAN et al., 2015).

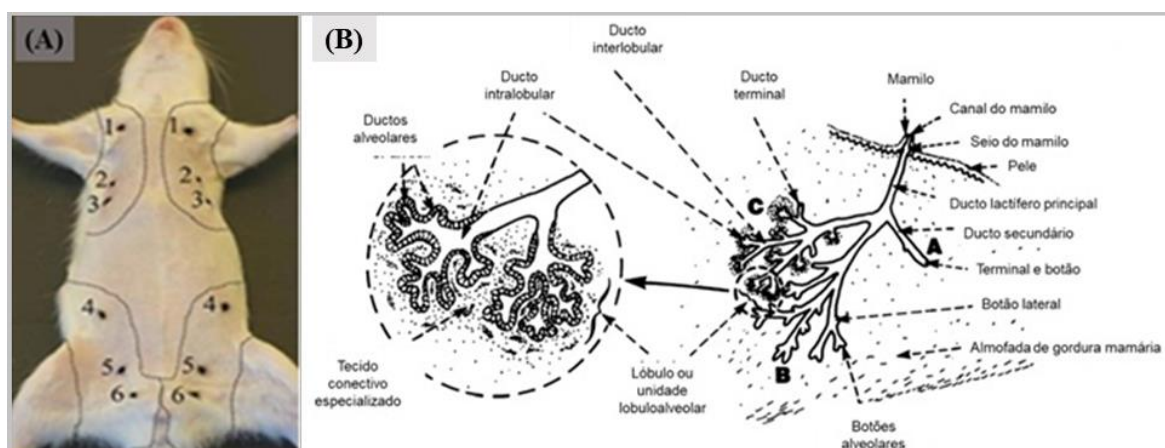
Figura 1 – Estrutura do alvéolo mamário



Fonte: Tratado de fisiologia médica (2013, p.265)

Nas ratas, a glândula mamária situa-se na área subcutânea da região cervical até a inguinal, como seis pares ventro-laterais, cada uma com sua própria papila mamária (Figura 2A) (PARMAR, 1996). Em mulheres, 10 a 20 ductos principais se unem e formam os seios lactíferos que se conectam por sua vez com cada uma das duas papilas mamárias (INMAN et al., 2015). Diferentemente, em ratas e camundongos fêmeas, todos os ductos unem-se em um único ducto coletor primário que se conecta com a papila mamária (figura 2B) (DELOUIS E RICHARD, 1993, WALTER et al., 1994, MASSO-WELCH et al., 2000). A morfologia da glândula mamária permanece similar durante todo o período de lactação que compreende cerca de 21 dias pós-parto, em ratas, até que ocorra o desmame e se inicie o processo de involução (MASSO-WELCH, P; DARCY, K; TANGLE-CASTOR, N, 2000).

Figura 2 – Localização dos pares de glândulas mamárias da rata (A) Estrutura ducto-alveolar da glândula mamária de ratas (B).



Fonte: Modificado de Barbosa (2019, p.2)

### 1.3 FISIOLÓGIA DA LACTAÇÃO

#### 1.3.1 Mamogênese na gestação e lactação

O maior desenvolvimento da glândula mamária ocorre durante a gravidez quando as concentrações de progesterona são mais altas e atuam em sinergia com os estrógenos, promovendo uma intensa multiplicação de células epiteliais mamárias (ARENDRT; KUPERWASSER, 2015; MACIAS; HINCK, 2012) Os estrógenos são importantes por induzir o aumento da ramificação ductal secundária e terciária e a progesterona por promover a alveologênese (GONZÁLEZ, 2002). A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é um

hormônio produzido pela placenta desde o início da gravidez e é também responsável, dentre outras funções, pelo desenvolvimento alveolar (NAPSO et al., 2018).

Nesse contexto, dentro do processo de maturação do tecido mamário, a angiogênese ocorre induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular. Este processo pode ter sua expressão gênica estimulada pelos hormônios esteroides estrógeno e progesterona, sendo sua síntese também modulada por ação da PRL (ANDRES; DJONOV, 2010). Dessa forma, cada alvéolo é envolvido por uma rede de capilares. Estes promovem um maior fluxo sanguíneo mamário e, conseqüentemente, um maior suprimento de nutrientes para a produção de leite (MACIAS; HINCK, 2012). Durante a mamogênese ocorre também uma expansão do tecido linfático. Isso proporciona a maior remoção da linfa da glândula mamária, a qual se origina da porção sérica do sangue que sai dos capilares (GONZÁLEZ, 2002; MACIAS; HINCK, 2012).

### **1.3.2 Lactogênese**

Nas últimas semanas de gravidez (15–20 semanas de gestação), se inicia a lactogênese I. Este processo ocorre quando os alvéolos produzem o colostro (SRIRAMAN, 2017), um leite secretado no pós-parto rico em imunoglobulinas, citocinas, lactoferrina, lactoperoxidase, oligossacarídeos, defensinas, bactérias benéficas e leucócitos (WITKOWSKA-ZIMNY; KAMINSKA-EL-HASSAN, 2017). Essa produção acontece em pequena quantidade devido aos altos níveis séricos de progesterona que inibem uma maior liberação de PRL, principal hormônio responsável pela produção do leite (MENCHETTI et al., 2016).

Prolactina é hormônio chave da lactação e pertence à mesma família do hormônio do crescimento humano e do lactogênio placentário humano (BEN-JONATHAN et al., 1996), sendo sintetizada e secretada pelas células lactotróficas da adenohipófise (FREEMAN, M; KANYICKSKA; LERANT, 2006). A secreção de PRL está sob o controle do eixo hipotalâmico-hipofisário e sua regulação é predominantemente inibitória, sendo a dopamina o principal fator inibitório de sua secreção (CROWLEY, 2015).

A dopamina é sintetizada pela via dopaminérgica tuberoinfundibular, localizada no hipotálamo, e liberada na circulação porta-hipofisária, atingindo os lactotrofos e acoplando-se a receptores específicos (D2) que existem em suas membranas. Dessa forma, ela atua inibindo a secreção de PRL (CROWLEY, 2015). Além disso, a secreção de PRL é regulada por um feedback negativo, no qual a própria atua via PRL-Rs localizados na via

dopaminérgica tuberoinfundibular para estimular a produção de dopamina hipotalâmica e, através desta, inibir sua própria secreção (GRATTAN, 2018). Assim, o controle neuroendócrino da secreção de PRL permite longos períodos de hipoprolactinemia, em mulheres que não estão amamentando (GRATTAN; KOKAY, 2008).

Após o parto, com a expulsão da placenta, ocorre uma queda imediata dos níveis de progesterona e, conseqüentemente, desbloqueio metabólico da PRL. Isso permite o aumento nos níveis da mesma, dando início à lactogênese II, aproximadamente 40 horas após o parto (SRIRAMAN, 2017). Durante esta etapa acontece a produção do leite de transição que representa um intermediário entre o colostro e o leite maduro. Esse período transicional ocorre até a produção de um leite com qualidades nutricionais que suportem as posteriores necessidades de desenvolvimento rápido do lactente. Após este período, o leite é considerado maduro e permanece com composição relativamente semelhante durante toda a lactação (ERIKSEN et al., 2018).

Após o início da produção do leite maduro, inicia-se outra fase da lactação denominada galactopoiese, ou lactogênese III (SRIRAMAN, 2017). Nesta fase, a frequente remoção do leite pela criança é a maior responsável pela manutenção da produção do mesmo. Dessa forma, a amamentação pode ser mantida por vários meses a depender da demanda de leite necessária ao lactente (CROWLEY, 2015).

A ocitocina é um hormônio produzido pelo hipotálamo e armazenado pela neurohipófise (ARMSTRONG; STERN, 1998). Através do estímulo de sucção, as fibras nervosas sensoriais da aréola desencadeiam um reflexo neuroendócrino aferente para o hipotálamo secretar fator de liberação de ocitocina que resulta no estímulo para liberação de ocitocina pela neurohipófise (BURBACH; YOUNG, L, 2017). A ocitocina estimula a contração das células mioepiteliais alveolares, drenando o leite dos alvéolos para os ductos lactíferos (BRUCKMAIER; WELLNITZ, 2008). O leite então se acumula nos seios lactíferos e é posteriormente liberado pelo mamilo através da sucção do bebê, estímulo que induz a liberação de mais ocitocina (NOSTRAND et al., 1991a).

Estímulos exteroceptivos como audição e olfato da mãe também atuam como estímulos neuroendócrinos para a liberação de ocitocina. Estresse ou ansiedade são fatores que promovem a estimulação adrenérgica, um fator inibitório da secreção de ocitocina, que pode impedir a produção de leite (FREEMAN, M; KANYICSKA; LERANT, 2006).

A ocitocina estimula também a liberação de PRL pela adenohipófise e atua como estímulo para redução da liberação de DA pelo sistema tuberoinfundibular dopaminérgico,

agindo também através dessa via, para manter a galactopoiese (CROWLEY, 2015). A PRL atua sobre as células epiteliais alveolares, estimulando a expressão de genes de proteínas do leite como a caseína e  $\alpha$ -lactalbumina, de enzimas necessárias para a síntese da lactose e dos triglicerídeos e de proteínas que regulam as várias etapas em diferentes processos de secreção (BRUNTON et al., 2010). Ela responde às demandas da produção de leite e direcionando os nutrientes do tecido adiposo para a glândula (FREEMAN, M; KANYICKSKA; LERANT, 2006; GRONER, 2002), interferindo dessa forma, na síntese dos principais constituintes do leite.

A PRL atua sobre as células epiteliais alveolares, estimulando a expressão de genes de proteínas do leite como a caseína e  $\alpha$ -lactalbumina, de enzimas necessárias para a síntese da lactose e dos triglicerídeos e de proteínas que regulam as várias etapas em diferentes processos de secreção (BRUNTON et al., 2010). Ela também responde às demandas da produção de leite e direcionando os nutrientes do tecido adiposo para a glândula (FREEMAN, M; KANYICKSKA; LERANT, 2006; GRONER, 2002), interferindo dessa forma, na síntese dos principais constituintes do leite.

A insulina é outro hormônio importante para a lactogênese, pois age estimulando a síntese de proteínas e lipídeos do leite (COHICK; BRUNSWICK, 2016). Além disso, estimula a captação de glicose pela glândula mamária para a síntese de lactose e para servir de substrato energético para o tecido mamário que se encontra em intenso metabolismo (ZHAO, 2014). Por isso, mulheres que apresentam resistência insulínica são susceptíveis a apresentar dificuldades na lactação que incluem a baixa produção de leite (NOMMSEN-RIVERS, 2016). Outros hormônios como esteroides, hormônio de crescimento, corticosteroides e hormônios tireoidianos também estão envolvidos na lactogênese e são essenciais para que a produção de leite ocorra e se mantenha com sucesso (WAGNER et al., 2018).

### **1.3.3 Involução**

O desmame é o ponto chave para o início da involução da glândula mamária. A partir do momento em que o estímulo de sucção cessa, acontece a estase do leite no interior dos ductos e alvéolos, sendo este o estopim para que se inicie uma série de alterações que caracterizam o curso da involução (JENA et al., 2019). Durante esse processo, ocorre a morte das células epiteliais alveolares com conseqüente remodelamento da árvore epitelial à

simples arquitetura ductal da fase não gravídica, além de outras grandes mudanças no tecido mamário (MACIAS; HINCK, 2012).

O processo de involução da glândula mamária apresenta duas fases. Em ratas, a primeira fase é reversível e acontece nas primeiras 48 horas após o desmame, podendo ser reestabelecida a lactação pelo estímulo de sucção (JENA et al., 2019). Nessa fase, inicia-se a apoptose da estrutura alveolar (MACIAS; HINCK, 2012).

Os processos decorrentes da fase apoptótica estão atribuídos à redução dos níveis de PRL circulante após o desmame decorrente da ausência do estímulo neuroendócrino de sucção (MASSO-WELCH, P; DARCY, K; TANGLE-CASTOR, N, 2000). Isto ocorre porque a atividade da glândula mamária e a sobrevivência de suas células dependem principalmente da ação da PRL que atua, em parte, inibindo a apoptose (ACCORSI et al., 2002; VARAS et al., 2002). Ainda, a estase do leite, que precede a primeira fase de involução parece contribuir para este processo através da indução da expressão de algumas proteínas apoptóticas, como por exemplo a TGF- $\beta$ 3, sem que tenha ocorrido ainda a degradação da matriz extracelular (NGUYEN; POLLARD, 2000).

A segunda fase é irreversível, pois ocorre quando a integridade alveolar está comprometida, sendo também denominada fase de remodelamento (JENA et al., 2019). Nessa etapa ocorre o aumento da degradação proteolítica da matriz extracelular devido ao aumento na atividade de proteases extracelulares (ACCORSI et al., 2002; VARAS et al., 2002), isquemia moderada como resultado da compressão da vasculatura causada pelo ingurgitamento do leite e diferenciação dos adipócitos que irão repopular o estroma após a perda alveolar (WATSON; KREUZALER, 2011). Em ratas, a apoptose do epitélio alveolar e a reorganização do estroma continuam até a glândula mamária estar completamente remodelada, no 21º dia de involução (RICHERT et al., 2000).

Além disso, resposta imune inata desempenha um papel importante em ambas as etapas da involução da glândula mamária. No estágio inicial da involução ocorre influxo de neutrófilos, seguido por macrófagos e linfócitos, proporcionando a eliminação de células apoptóticas, resíduos celulares e componentes do leite e da matriz extracelular (WATSON; KREUZALER, 2011).

As proteínas da família STAT também possuem grande importância no processo de involução da glândula mamária tanto na primeira, quanto na segunda fase. Após o desmame, ocorre desativação da STAT5, proteína ativada pela PRL e que tem o efeito de proteção sobre as células alveolares e ativação da STAT3 (BRENMOEHL et al., 2018). A proteína

STAT3, por sua vez, é considerada um grande ativador da involução mamária (JENA et al., 2019), sendo responsável pela via da morte celular e pelo influxo de células inflamatórias para o tecido mamário (WATSON; KREUZALER, 2011).

#### 1.4 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO LEITE MATERNO

O leite materno é uma matriz complexa contendo, além de compostos bioativos como hormônios, fatores de crescimento, imunoglobulinas, probióticos, micro e macronutrientes (GARWOLIŃSKA et al., 2018). A concentração destes macronutrientes no leite materno difere entre os mamíferos e é influenciada por diversos fatores, tais como dieta, frequência de amamentação, paridade, peso da mãe, estágio de lactação, idade e etnia da mãe, dieta materna, peso da mãe, peso do bebê ao nascer e prematuridade (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015; ARGOV-ARGAMAN et al., 2017).

O colostro apresenta altas concentrações proteicas e baixas concentrações de lactose e gordura, o que evidencia que suas funções imunológicas e tróficas sobrepõem a função nutricional, em relação ao leite maduro (MENCHETTI et al., 2016). O leite maduro possui de duas a três vezes mais lipídeos que o leite do início da amamentação, apresentando variações durante o dia. Esta maior concentração ocorre devido ao aumento das necessidades energéticas do bebê ao decorrer do seu crescimento (YUAN et al., 2019). As concentrações de lactose apresentam-se relativamente constantes durante toda a lactação (GIDREWICZ; FENTON, 2014).

A proteínas do leite podem ser divididas em proteínas do soro, caseínas e mucinas (LÖNNERDAL, 2003), sendo as caseínas,  $\alpha$ -lactoalbuminas, lactoferrinas, IgA, lisozima e albumina as mais abundantes (HASCHKE; HAIDEN; THAKKAR, 2017). O leite materno fornece, através desta constituição, todos os aminoácidos necessários para a síntese de novas proteínas. Estas serão importantes para o crescimento estrutural e proteção imunológica do bebê, bem como para benefícios sobre reposição das perdas proteicas decorrente da urina, fezes e descamação da pele (HASCHKE; HAIDEN; THAKKAR, 2017). A maior parte das proteínas presentes no leite são sintetizadas pelos lactócito e o restante, como por exemplo, a albumina sérica, é proveniente da circulação materna (LÖNNERDAL, 2003).

Os lipídeos são a maior fonte de energia do leite materno (KOLETZKO et al., 2001) e a fração de macronutrientes mais variável e mais influenciada pela ingestão alimentar da mãe (KEIKHA et al., 2017). Os lipídeos presentes no leite são derivados dos lipídeos da dieta da mãe, da mobilização do tecido adiposo e da síntese de novo pela glândula mamária

(COSTA; WILLIAMSON, 1994). O componente majoritário da fração lipídica são os triacilglicerídeos, correspondendo a cerca de 98% dos lipídeos totais. Ainda, a fração lipídica contém ácidos graxos, fosfolipídios, colesterol, mediadores químicos, como as lipoxinas anti-inflamatórias, vitaminas lipossolúveis, entre outros (ANDREAS; KAMPMANN; MEHRING LE-DOARE, 2015).

O principal carboidrato do leite materno humano é a lactose, um dissacarídeo exclusivo do leite, de fácil digestão, que serve de substrato energético para o lactente (NEVILLE, 2008). Além disso, a lactose apresenta uma grande função na síntese láctea, sendo o principal componente osmótico de forma que a sua síntese é responsável pela extração de água para o leite (ZHAO, 2014).

Na rata, a concentração de proteínas no leite é estável na primeira semana de lactação, aumenta durante o período intermediário e começa a decair no início da lactação tardia. (KEEN et al., 1981a). Brandorff (1980) demonstrou em seu experimento que ratas lactantes alimentadas com dieta hiperlipídica apresentaram um aumento no teor de ácidos graxos no leite. Em ratas, estudos demonstram que a concentração de carboidratos presente no leite materno aumenta do primeiro ao décimo quarto dia de lactação, seguido de pequenas variações até o vigésimo primeiro dia. Ainda, redução da ingestão alimentar diminui a concentração de lactose no leite de rata (KEEN et al., 1981a).

## 1.5 SUBSTÂNCIAS GALACTAGOGAS

As taxas de desmame precoce em todo mundo são altas: 63% das crianças menores de 6 meses em todo o mundo não são amamentadas (VICTORA et al., 2016) e a percepção da baixa produção de leite é citada por muitas mães como razão para cessar a amamentação, em diversas populações (BAZZANO et al., 2017). As razões para a produção insuficiente de leite materno vão desde situações emocionais de ansiedade, fadiga, estresse, parto prematuro, separação mãe-bebê e re-lactação (ASZTALOS, 2018), até disfunções endócrinas como hipotireoidismo, obesidade, diabetes e síndrome do ovário policístico (WAGNER et al., 2018)

Para mulheres que continuam a experimentar baixa produção de leite mesmo com a utilização de estratégias não farmacológicas de apoio à lactação, é comum a intervenção com galactagogos que são medicamentos, plantas e alimentos auxiliares da iniciação, manutenção ou aumento da produção de leite (BRODRIBB, 2018). A maioria dessas substâncias exerce seus efeitos farmacológicos alterando o complexo hormonal que regula a



lactação, agindo principalmente sobre a PRL e a ocitocina de forma a aumentar a produção de leite (GRZESKOWIAK; WLODEK; GEDDES, 2019).

Atualmente são conhecidos medicamentos e plantas medicinais com atividade galactagoga, porém a utilização destes demanda cuidados, pois ainda é necessária a realização de estudos bem delineados para avaliação de sua eficácia e segurança (BRODRIBB, 2018). Os fármacos galactagogos mais utilizados são a metoclopramida e a domperidona. Além desses, outros como clorpromazina, hormônio de crescimento, hormônio secretor de tireotropina e o antipsicótico clorpromazina são utilizados também como galactagogos (GRZESKOWIAK; WLODEK; GEDDES, 2019), porém com pouca frequência devido à necessidade de mais estudos clínicos que validem sua segurança (BAZZANO et al., 2017; BRODRIBB, 2018).

A metoclopramida é um antiemético utilizado para o refluxo gastroesofágico (MADISCH et al., 2017). Seu mecanismo de ação galactagogo ocorre através de um antagonismo dopaminérgico no sistema nervoso central, aumentando assim os níveis de PRL secretados e, conseqüentemente, a produção de leite (TABRIZI; MIRGHAFORVAND; SEYEDI, 2017). Esta droga pode causar efeitos colaterais extrapiramidais que incluem tremores, bradicinesia, outras reações distônicas, sonolência e desconforto abdominal (GRZESKOWIAK; WLODEK; GEDDES, 2019).

A domperidona atua da mesma forma que a metoclopramida, antagonizando o efeito da dopamina, porém exerce suas ações farmacológicas periféricamente e não centralmente. Este mecanismo de ação faz com que os efeitos colaterais extrapiramidais sejam reduzidos (GRZESKOWIAK; WLODEK; GEDDES, 2019). Este medicamento possui características que contribuem para que uma quantidade limitada do fármaco atravesse a barreira hematoencefálica: menor lipossolubilidade, maior peso molecular, e baixo teor de proteína de ligação em relação à metoclopramida (PAUL et al., 2015).

Os efeitos colaterais associados à domperidona incluem boca seca, dor de cabeça e cólicas abdominais (OSADCHY; MORETTI; KOREN, 2012). Os efeitos galactagogos observados são modestos, havendo a necessidade de mais estudos para assegurar sua eficácia e efeitos sobre a composição de micro e macronutrientes do leite (GRZESKOWIAK; WLODEK; GEDDES, 2019). Portanto, o efeito dos fármacos galactagogos mais utilizados contribuem para o aumento da produção do leite materno. No entanto, o mecanismo de ação destes podem causar efeitos colaterais nos pacientes. Com isso, é preciso ampliar o

conhecimento dos efeitos destes medicamentos e, posteriormente, avaliar os benefícios de sua aplicação em mulheres com baixa produção de leite durante a lactação.

A utilização de plantas medicinais é uma alternativa mais econômica em relação aos medicamentos alopáticos e seu uso tradicional é perpassado através de várias gerações (BRODRIBB, 2018). Por isso, a aplicação de plantas medicinais como fitoterápicos tem sido crescente em todo o mundo (SINGH, 2015). Porém, ainda não existe suporte por profissionais convencionais da saúde para a utilização dessas plantas como galactagogos. Com isso, mais estudos sobre seus possíveis efeitos toxicológicos e eficácia são necessários para validar cientificamente seu uso no tratamento e melhorar a qualidade da lactação (BAZZANO et al., 2017; BRODRIBB, 2018).

Dentre as ervas galactagogas, destaca-se o feno-grego (*Trigonella foenum-graecum*), pertencente à família Fabaceae, por ser a erva mais utilizada no mundo para aumentar a produção de leite (KHAN; WU; DOLZHENKO, 2018). O funcho, *Foeniculum vulgare*, da família Apiaceae, nativo do sul da Europa e do Mediterrâneo tem demonstrado bons resultados galactagogos, além de utilidade para tratar cólicas em crianças (JAVAN; JAVADI; FEYZABADI, 2017). A tintura de algodoeiro, fitoterápico produzido a partir da casca da raiz, folhas e sementes de algodoeiro (*Gossypium herbaceum*), também contribui positivamente para aumentar a produção de leite, além de apresentar baixo potencial de toxicidade (MELLO et al., 2008).

Ainda, outras ervas como cardo santo (*Cnicus benedictus*), urtiga (*Urtica dioica*), rue de cabra (*Galega officinalis*), *Hibiscus sabdariffa* Linn e *Silybum marianun* também têm demonstrado propriedades galactagogas (BAZZANO et al., 2017; SIM et al., 2015), dando explicação ao uso empírico dessas plantas.

### 1.6 *Valeriana officinalis* L.

*Valeriana* (*Valeriana officinalis* L.) é uma planta perene e nativa da América do Norte, Ásia e Europa, pertencente à família Valerianaceae. É um dos fitoterápicos mais popularmente utilizados para tratar a insônia devido a suas propriedades sedativas e hipnóticas e menos comumente, mas também utilizado como ansiolítico por seus efeitos calmantes (SEIDLER-LOZYKOWSKA; MIELCAREK; BARANIAK, 2009).

Geralmente, a raiz de *Valeriana* é a parte utilizada para a preparação de fitomedicamentos de efeito ansiolítico (FERNÁNDEZ et al., 2004), sendo constituída por mais de 150 componentes identificados (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2008),

Dentre eles estão valpotriatos, óleos voláteis (valeranona, valeranal e ácidos valerênicos), sesquiterpenos, lignanas, alcaloides e aminoácidos livres, como o gama-aminobutírico (GABA), tirosina, arginina e glutamina (HADLEY; PETRY, 2003). Os valepotriatos e ácidos valerênicos são geralmente considerados os maiores responsáveis pela ação sedativa da planta (SEIDLER-LOZYKOWSKA; MIELCAREK; BARANIAK, 2009).

Os efeitos sedativos e ansiolíticos de valeriana ocorrem provavelmente por modulação do sistema GABAérgico, através da potenciação da maior liberação do GABA e inibição de sua recaptação ou degradação (BENT et al., 2006; SAVAGE et al., 2018). Devido a sua ação sedativa leve, valeriana é comumente utilizada por mulheres lactantes para o tratamento de distúrbios comuns no pós parto como ansiedade, insônia e depressão, em substituição a sedativos mais fortes como os benzodiazepínicos (ALLAIRE; MOOS; WELLS, 2000; CHRISTIAN et al., 2019; JACOBSON, 2004).

O estresse é um fator inibitório da liberação de ocitocina pela neurohipófise, o que pode diminuir a produção de leite, durante a amamentação (COX et al., 2015; WINTER; JUREK, 2019). Dessa forma, pode-se sugerir que valeriana, através de sua ação sedativa e calmante, atue evitando a desregulação da fisiologia da lactação, agindo de forma indireta sobre essa via e tendo influência positiva sobre produção de leite. Apesar do seu uso por mulheres que amamentam e de sua ação calmante, não existem estudos que avaliem a influência da valeriana sobre a produção de leite.

O uso de valeriana parece ser seguro, pois os efeitos colaterais mais comuns são sintomas neurológicos leves como tontura, dor de cabeça, sonolência ou sintomas gastrointestinais como náusea e diarreia (ORTIZ; NIEVES-NATAL; CHAVEZ, 1999). O ácido valproico, um dos antiepiléticos mais prescritos no mundo, é um análogo do ácido valérico proveniente de valeriana (PERUCCA, 2002). Por ser excretado em baixas concentrações no leite materno e não parecer ser danoso ao lactente, seu uso durante a amamentação é permitido pela American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. Apesar disso, ainda não existem dados claros sobre a segurança do uso da valeriana durante a lactação devido aos raros estudos avaliando a secreção dos outros constituintes dessa planta no leite e os possíveis efeitos toxicológicos que podem ser causados ao lactente durante esse período (LACTMED, 2018).

## 2 JUSTIFICATIVA

A importância do aleitamento materno envolve benefícios nutricionais ao bebê, além de prevenção de mãe e criança contra doenças, a curto e a longo prazo (CHOWDHURY et al., 2015; UNICEF; WHO, 2016). Dessa forma, do ponto de vista epidemiológico, a amamentação é uma estratégia de combate à mortalidade infantil, podendo sua ampliação para um nível quase universal impedir 823.000 mortes anuais em crianças com menos de 5 anos e 20.000 mortes maternas adicionais por câncer de mama, em mulheres. (VICTORA et al., 2016).

Como barreira aos amplos benefícios da amamentação, o suprimento inadequado de leite materno é um motivo frequentemente relatado para a interrupção precoce da amamentação (BAZZANO et al., 2017). Isso faz com que muitas mulheres recorram ao uso de substâncias galactogogas para tratar a hipogalactia (GRZESKOWIAK; WLODEK; GEDDES, 2019).

Valeriana é um dos fitoterápicos mais populares para tratar a insônia e a ansiedade em todo o mundo (SEIDLER-LOZYKOWSKA; MIELCAREK; BARANIAK, 2009), sendo utilizado inclusive por mulheres lactantes (ALLAIRE; MOOS; WELLS, 2000; CHRISTIAN et al., 2019). Apesar desse uso, não existem estudos sobre a atividade galactogoga dessa planta. Porém, pode-se sugerir que valeriana, através de sua ação sedativa e calmante, atue evitando a desregulação da fisiologia da lactação, uma vez em que o estresse interfere na liberação de ocitocina e pode levar a diminuição da produção de leite (WINTER; JUREK, 2019).

Diante desse contexto, uma vez evidenciada a atividade galactogoga do extrato etanólico de *Valeriana officinalis* L., esta planta poderá ser fonte terapêutica para a produção de novos fitoterápicos e fitomedicamentos galactogogos, sendo mais uma alternativa disponível para tratar a baixa produção de leite. Através de estudos como este, a manutenção da amamentação é incentivada dentro da atenção básica como uma intervenção econômica e eficaz para combater a mortalidade infantil e diversas doenças, trazendo benefícios a curto e longo prazo para a saúde pública (ROLLINS et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2013).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade galactagoga do extrato etanólico de *V. officinalis* L. e da sua fração diclorometano, em modelo experimental animal.

#### 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a) Avaliar o efeito galactagogo do extrato etanólico de Valeriana (*V. officinalis*) e da sua fração diclorometano no ganho de peso da ninhada, perda de peso da mãe e estimativa da produção de leite;
- b) Analisar a influência do extrato etanólico de Valeriana (*V. officinalis*) e da sua fração diclorometano sobre as concentrações dos macronutrientes do leite,
- c) Avaliar a influência do extrato etanólico de Valeriana (*V. officinalis*) e da sua fração diclorometano sobre o padrão histológico das glândulas mamárias;
- d) Avaliar a influência do extrato etanólico de Valeriana (*V. officinalis*) e da sua fração diclorometano sobre as concentrações de prolactina e ocitocina sérica, hipofisária e da glândula mamária;
- e) Avaliar o perfil fitoquímico e identificar o(s) possível(eis) compostos bioativos do extrato etanólico e fração de diclorometano de Valeriana (*V. officinalis*).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS

A planta utilizada neste experimento foi adquirida através da distribuidora Nutri Ervas®, na forma de raízes e rizomas de *V. officinalis* L. (Lote 071300). O material foi submetido à maceração com etanol absoluto (Synth®), permanecendo em contato com o solvente por 72h, ao abrigo de luz e à temperatura ambiente. Durante esse período, a mistura foi agitada manualmente, de forma esporádica. Após o período de maceração, o extrato obtido foi filtrado e, posteriormente, concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida para eliminar o etanol, fornecendo assim o extrato seco. Uma parte do extrato foi diluído em 10% de etanol e 90% de água destilada (v/v), fornecendo o extrato etanólico de *V. officinalis* L. (EEVO) que foi utilizado nos testes com animais.

O restante do extrato seco foi submetido ao fracionamento por extração líquido-líquido utilizando solventes em gradiente crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). A partição deu origem às frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol que foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida até eliminação total dos solventes, obtendo as frações secas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2006). A fração diclorometano foi posteriormente diluída em 10% de etanol e 90% de água destilada, sendo obtido o extrato etanólico da fração diclorometano (FD) que foi testado nas doses determinadas de acordo com os resultados obtidos com o extrato etanólico.

### 4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

As análises fitoquímicas possibilitam a revelação qualitativa das diferentes classes de metabólitos secundários presentes no extrato da planta, como polifenóis, taninos, saponinas, flavonoides, esteroides e alcaloides (BROSSI, 1988; COSTA, 2001; WAGNER; BLAD; RICKL, 2001). Para a realização dessas análises, foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD). Uma amostra de cada extrato seco separadamente foi diluída em etanol absoluto. Uma pequena alíquota de cada solução foi aplicada à uma placa de alumínio coberta com sílica em gel (Macherey-Nagel®), com o auxílio de um tubo capilar. O sistema eluente utilizado foi específico para cada tipo de teste, como descrito a seguir.

Para a detecção de polifenóis foi utilizado à fase móvel de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27). A placa cromatográfica foi revelada pulverizando uma mistura de 1:1 das soluções aquosas de ferrocianeto de potássio 1% (m/v) e cloreto de ferro 2% (m/v) nas placas (ANEXO A), que foram analisadas no visível. O aparecimento de manchas azuladas indica a presença de polifenóis.

Para a detecção de saponinas foi utilizada como fase móvel clorofórmio: metanol (9:1) eluindo duas vezes. As saponinas foram visualizadas pela pulverização de ácido sulfúrico concentrado em etanol a 5% (v/v) após aquecimento das placas a 110 °C, durante 5 minutos. O aparecimento de manchas de coloração roxo berinjela, no visível, indica a presença de saponinas.

Para a detecção de taninos foi utilizada como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (10:11:11:27). O revelador utilizado foi solução metanólica de cloreto férrico a 2% (ANEXO A). O aparecimento de manchas esverdeadas, ao visível, indicam a presença de taninos.

Para a análise de flavonoides e ácidos fenólicos foi utilizado a fase móvel acetato de etila: hexano (7:1). Na placa de sílica, foi pulverizado o reagente cloreto de alumínio em etanol a 1% (m/v). A visualização das manchas foi feita sob luz Ultravioleta (BIOTEC®), a 366 nm. Os flavonoides apareciam como manchas verdes fluorescentes enquanto que os ácidos fenólicos surgiam como manchas azuis fluorescentes.

Para a análise de esteroides foi utilizado como fase móvel hexano: acetato de etila (8:2). O reagente de Liebermann-Burchard (ANEXO A) foi pulverizado na placa que foi, sequencialmente, levada ao aquecimento a 110°C durante 5 minutos. O aparecimento de manchas roxas no visível indica a presença de esteroides.

Para a detecção de alcaloides foi utilizada como fase móvel acetato de etila: metanol: água (4:1:2). O reagente de Wagner (ANEXO A) foi pulverizado na placa e o aparecimento de manchas castanho-avermelhadas, no visível, indica a presença de alcaloides.

#### 4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA

Os ensaios realizados neste projeto foram bioguiados, ou seja, os estudos químicos e farmacológicos foram sendo realizados conjuntamente, dando continuidade com as frações das plantas que apresentaram composição química com possíveis compostos bioativos.

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) foram realizadas em aparelho QP2010SE (GC2010 Plus) da marca Shimadzu usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25  $\mu\text{m}$ ) e hélio como gás de arraste. Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM). Antes de serem analisados por cromatografia gasosa, as amostras foram submetidas a derivatização por sililação.

Para esta análise fosse feita, foram pesados 2 mg de cada amostra do extrato etanólico e fração de diclorometano em vial, onde foram diluídos em 60  $\mu\text{L}$  de piridina. A esta solução foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da mistura reacional de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma-Aldrich®). Essa mistura foi aquecida a 70 °C por 30 minutos em banho maria e, posteriormente, 1  $\mu\text{L}$  de cada mistura foi injetado no CG-EM, em aplicações separadas (CRUZ et al., 2016).

A temperatura empregada na análise no injetor, detector e interface do sistema CG-EM foi 290 °C. A temperatura inicial da análise foi de 80 °C por 5 min, aumentando de a 285 °C na razão de 4 °C/min. A temperatura final permaneceu em 285 °C por 40 minutos (CRUZ et al., 2016). O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 30 a 600 Da. A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras, com aqueles existentes no banco de dados do aparelho (NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8).

#### 4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ANIMAL

Para todos os experimentos foram utilizadas ratas fêmeas Wistar que ainda não haviam passado por um processo de cruzamento, nascidas a pelo menos 3 meses e pesando entre 200-250g. Esses animais foram obtidos do biotério setorial da Universidade Federal da Bahia e mantidas no ciclo claro-escuro 12 horas (luzes acessas das 6 às 18 horas), a temperatura de  $23\pm 2^\circ\text{C}$  e a umidade relativa de  $50\pm 2$ . Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno contendo maravalha na base da caixa, sendo permitido livre acesso à comida (Labina®, Purina) e água. O presente projeto foi aprovado pelo CEUA local do IMS-UFBA de acordo com a lei nº 11.704/09, do protocolo 063/2018 (ANEXO B).

Para que se iniciassem os experimentos, as fêmeas passaram pela etapa de cruzamento, onde foi realizada a determinação do ciclo estral de cada uma através do lavado vaginal. O fluido vaginal foi coletado com uma pipeta de plástico contendo uma gota de solução salina (NaCl a 0,9%) que foi injetada, aspirada e colocada na lâmina para



visualização ao microscópio nas objetivas de 10 e 40x. As fêmeas que tiveram a presença predominante de células arredondadas, polinucleadas, dispersas ou agrupadas, indicando a fase de proestro ou de células cornificadas, com o aspecto de “folhas secas”, indicando a fase estral, foram colocadas juntas aos machos em uma mesma caixa, na proporção de 1 macho e 3 fêmeas por caixa, durante uma semana. Os experimentos foram iniciados após o nascimento dos filhotes das fêmeas que obtiveram êxito na etapa do cruzamento, por volta de 21 dias após este procedimento.

Cada rodada de experimento com os animais teve a duração de 20 dias, a partir do nascimento dos filhotes. Durante esse tempo, alguns procedimentos foram realizados: ajuste dos filhotes, administração da substância nas ratas, pesagem dos filhotes e da mãe, ordenha das ratas lactantes e sacrifício, de acordo com o cronograma da Figura 1. Estes procedimentos serão descritos separadamente e detalhadamente nas próximas seções deste trabalho.

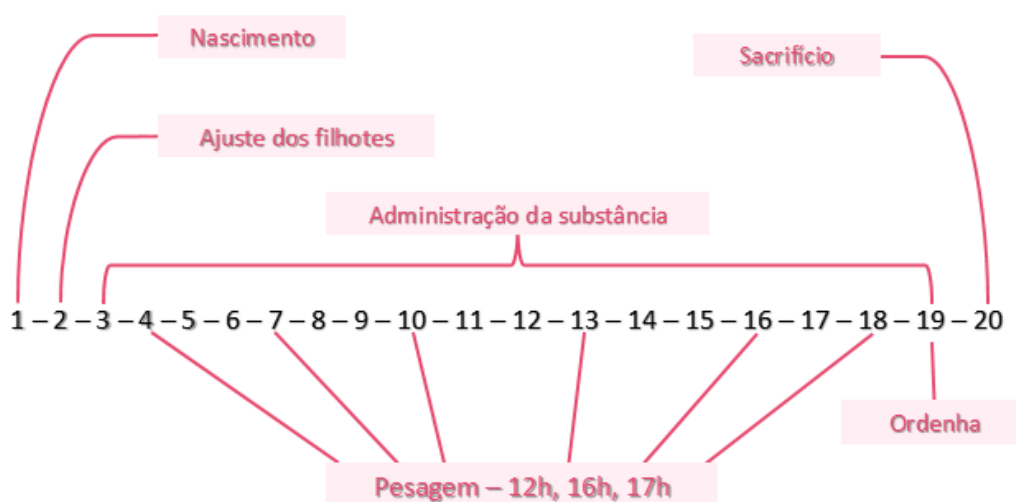


Figura 3 - Delineamento experimental

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA, PERDA DE PESO DA MÃE E OUTROS PARÂMETROS DA ATIVIDADE GALACTAGOGA

Inicialmente foi realizado um estudo piloto para avaliar se o etanol utilizado na preparação dos extratos poderia apresentar alguma alteração significativa sobre a produção de leite e, conseqüente, sobre os resultados do experimento a ser desenvolvido. Foram utilizadas 12 ratas lactantes no início da lactação, amamentando de sete a oito filhotes. Estas ratas foram divididas em dois grupos experimentais, sendo que o grupo 1 (n=6) recebeu 0,4

mL de água destilada e o grupo 2 (n=6) recebeu 0,4 mL de etanol a 10%. Os animais do estudo piloto foram submetidos à mesma metodologia de pesagem do experimento efetivo, descrita a seguir.

Para a avaliação do ganho de peso da ninhada e atividade galactagoga da Valeriana, foram utilizadas 48 ratas lactantes, no início da lactação, amamentando de sete a oito filhotes, divididas em oito grupos experimentais. O grupo 1 recebeu 0,4 mL água destilada (n=6) e os grupos 2, 3, 4, 5 e 6 receberam EEVO nas doses de 200 mg/kg, 100 mg/kg, 50 mg/kg, 25 mg/Kg e 12,5mg/kg (n= 6), respectivamente. Os grupos 7 e 8 receberam FD nas doses de 50mg/Kg e 25mg/kg, respectivamente. A partir dos parâmetros avaliados nesse experimento, foram determinadas as doses mais efetivas de EEVO e FD.

No 1º dia de nascimento dos filhotes não houve manipulação, sendo este um período de adaptação dos filhotes. No 2º dia de vida, o número de filhotes foi ajustado de maneira que cada rata lactante ficou com oito filhotes, quatro machos e quatro fêmeas. Os filhotes excedentes foram eutanasiados por deslocamento cervical. Esta padronização é importante uma vez em que vários trabalhos têm demonstrado que o número de filhotes e o sexo influenciam diretamente na produção de leite (GRIGOR; POCZWA; ARTHUR, 1986a), A partir do 3º até o 19º dia de vida, todas as ratas lactantes foram tratadas diariamente com água destilada (grupo controle), extrato etanólico em suas diferentes concentrações e fração diclorometano em suas diferentes concentrações, através de injeção intraperitoneal, sempre às 18h.

Para o acompanhamento de mudanças no peso da mãe e da ninhada, as ratas lactantes e os filhotes foram pesados nos 4º, 7º, 10º, 13º, 16º e 18º dias de vida dos filhotes, usando uma balança eletrônica analítica de precisão. Nesses dias, os filhotes foram pesados às 12 h (P1) e subsequentemente isolados de suas mães por 4 horas, entre 12 h e 16 h. Às 16h, os filhotes foram pesados novamente (P2) e, em seguida, retornaram para suas mães para a amamentação por uma hora. Às 17 h, os filhotes foram pesados mais uma vez (P3) e retornaram para suas mães onde ficaram até o próximo dia de pesagem. As mães foram pesadas nos mesmos dias que os filhotes, às 16h e 17h. Foi estimada a perda de peso da mãe através da pesagem das 17 h do 18º dia de experimento diminuída pela pesagem das 16h do 4º dia de experimento.

O ganho de peso diário dos filhotes foi calculado pela diferença entre os pesos obtidos por P1 dividido pelo número de dias entre os intervalos de pesagens. O ganho de

peso total durante todo o experimento foi calculado por P3 do 18º dia menos P1 do 4º dia de vida dos filhotes.

Durante a amamentação (entre P2 e P3), nas três últimas pesagens, foi observado o comportamento das mães e preenchido um formulário (ANEXO C), no intuito de observar o aparecimento de possíveis efeitos tóxicos do extrato. Foi analisado a presença de piloereção, alteração da atividade locomotora, diarreia, postura de amamentação, organização e manutenção do ninho, recolher e lambar os filhotes, e mortes. Durante esse tempo de uma hora de observação foi também cronometrado o tempo de amamentação da mãe para posterior análise.

A produção de leite durante o período de 1 hora de amamentação foi estimada por meio da diferença do peso dos filhotes das 17 h (P3) e 16 h (P2), sendo que este valor foi corrigido pela perda de peso metabólica dos filhotes devido a processos como respiração, defecação e perda urinária. A perda de peso metabólica foi estimada pela perda de peso dos filhotes que ocorre durante o período em que estes estão separados da mãe das 12h às 16h (P1 – P2) dividido por 4, equivalente às 4 horas de separação (MESSIAS et al., 2019) (Figura 2).

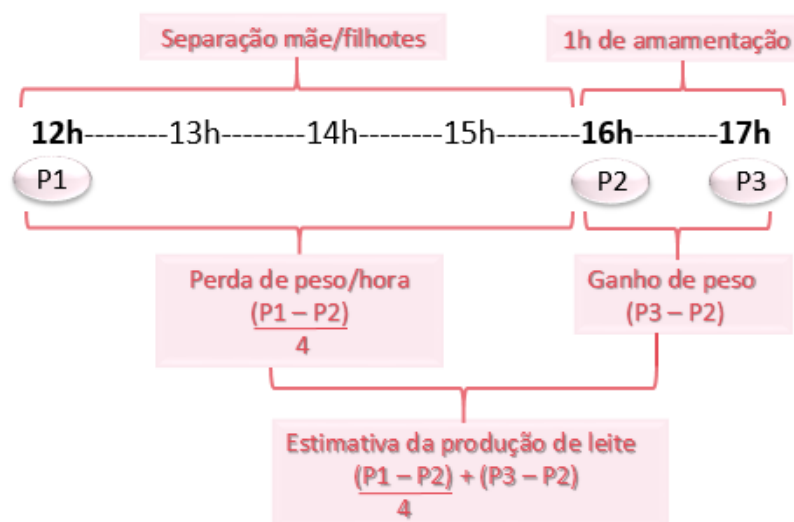


Figura 4 - Estimativa da produção de leite em 1 hora

#### 4.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO LEITE

Foi feita a análise da composição bioquímica do leite de ratas tratadas com a dose mais ativa de EEVO e a dose mais ativa de FD. Para que essa análise fosse realizada, no

décimo nono dia do experimento, foi feita a ordenha das ratas. Antes de se iniciar a coleta do leite, as ratas lactantes foram separadas dos filhotes por duas horas e após este período estes retornam para suas mães por trinta minutos. Posteriormente, as ratas lactantes foram anestesiadas com uma mistura de ketamina e xilazina (dose 30mg ketamina: 6 mg xilazina/kg peso corporal ratas), por injeção via intraperitoneal. Após início do efeito anestésico, foi aplicada a ocitocina (0,5 UI / rata, Syntocinon® Sandoz, Brazil) via intradérmica, para estimular o fluxo de leite.

As amostras de leite foram obtidas por compressão manual das mamas das ratas. Gotas foram coletadas com auxílio de micropipetas e esvaziadas em tubos eppendorf de polipropileno. As amostras coletadas foram mantidas a - 70°C para posterior análise dos constituintes do leite. O tempo de coleta do leite para cada rata lactante foi de aproximadamente 30 min e a ordenha aconteceu sempre às 13h, para minimizar possíveis variações diurnas na composição do leite (GRIGOR; POCZWA; ARTHUR, 1986a). O leite foi coletado apenas uma vez em cada rata lactante, pois foi demonstrada que várias ordenhas levam a mudanças na sua composição (KEEN et al, 1980).

As dosagens bioquímicas de proteínas totais, lipídios totais, lactose, triglicerídeos e colesterol nas amostras de leite das ratas lactantes e dos filhotes foram realizadas por espectrofotometria em analisador automatizado da marca Mindray® modelo BS-120. Para as análises foi necessário realizar a diluição do leite na relação 1:5 para as dosagens de proteínas total e colesterol, 1:20 para a dosagem de triglicerídeos e 1:15 para as dosagens de lactose, sendo os valores de absorbância encontrados passados por uma correção devido a essa diluição.

Para a dosagem de proteínas totais foi utilizado o método colorimétrico de Biureto. Esse método se baseia na reação das ligações peptídicas das proteínas com os íons cúpricos do reagente formando um complexo de cor violeta que tem absorbância máxima em 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra. Para esta determinação, foram utilizados reagentes da marca Biotécnica® (Gold Analisa Diagnóstica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Os valores foram expressos em g/L para proteínas totais. Apesar deste método não ser muito sensível, continua sendo recomendado para a determinação da concentração de proteínas totais no leite quando comparado com outros métodos (VERHEUL et al., 1986; ZAIA; ZAIA, 1998).

Para a dosagem triglicerídeos foi utilizado um método colorimétrico baseado na reação de Trinder, onde os triglicérides são hidrolisados pela lipase lipoproteica e o glicerol

liberado é fosforilado pela glicerolquinase formando glicerolfosfato que é oxidado a dihidroxiacetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através de reação de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com o a 4-aminoantipirina (4-AMP) e 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina de cor vermelha. A absorvância do complexo medida em 505 nm é diretamente proporcional à concentração de triglicérides (TRINDER, 1969). Para a análise, foram utilizados reagentes para determinação quantitativa da marca Biotécnica<sup>®</sup> (Gold Analisa Diagnóstica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Os valores foram expressos em g/L.

O colesterol foi quantificado por método colorimétrico utilizando kit comercial Labtest e os resultados expressos em g/L. De acordo com o método, os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol-esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela enzima colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvância máxima em 500 nm (HUANG; KUAN; GUILBAULT, 1975).

O teor de lactose foi determinado usando o método colorimétrico baseado na reação com ácido pícrico (COSTA; DOREA; T.H.M., 1992; PENHA-SILVA et al., 2004). A solução de ácido pícrico foi preparada a uma concentração de 1,6 %, dissolvendo-se 16 g do ácido pícrico em 1 L de água desionizada, com 22 aquecimento até sua total dissolução. A solução foi mantida à temperatura ambiente por alguns dias, até formar cristais, o sobrenadante foi filtrado e conservado em frasco âmbar à temperatura ambiente.

As concentrações de lactose das amostras de leite foram determinadas pela equação de regressão da reta padrão de lactose. Em cada experimento foi preparada uma série com 5 tubos de ensaio designados branco, A, B, C e D. A cada um desses tubos foram inicialmente adicionados 250, 200, 150, 100 e 50  $\mu$ L de água desionizada, e depois 0, 50, 100, 150 e 200  $\mu$ L da solução estoque de lactose a 5 g/dL, de tal forma que as concentrações de lactose foram, respectivamente, de 0, 1, 2, 3 e 4 g/dL. Em seguida, cada tubo recebeu 4,75 mL da solução de ácido pícrico, com agitação até obtenção de uma solução homogênea.

Alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada tubo e transferidas para outra série de 5 tubos com a mesma identificação, utilizando-se ponteiras individuais para cada tubo. A cada tubo foram então adicionados 0,5 mL da solução de carbonato de sódio anidro. Após homogeneização das soluções, os tubos de ensaio foram incubados por 20 minutos em água fervente. Depois de resfriamento sob água corrente, cada tubo recebeu 8,5 mL de água

desionizada. Após homogeneização, as misturas dos tubos A, B, C e D foram analisadas por espectrofotometria em 520 nm, em um espectrofotômetro Micronal™, modelo B442, zerado com a solução do tubo branco. Os valores de absorvância em 520 nm foram locados contra as respectivas concentrações de lactose e ajustados, por regressão linear, a uma reta, aqui designada como reta padrão de lactose, com a utilização do programa Origin 6.0 (Microcal, Inc.).

Foram utilizados tubos de centrífuga, para análise das amostras de leite, sendo que cada tubo recebia inicialmente 100 µL de leite, 150 µL de água desionizada e 4,75 mL da solução saturada de ácido pícrico. Após centrifugação a 2000 rpm, por 10 minutos, em uma centrífuga FANEM®, alíquotas de 1 mL do sobrenadante eram transferidas para outra série de tubos de ensaio, em duplicata, com a mesma identificação. A cada tubo dessa série eram então adicionados 0,5 mL da solução de carbonato de sódio anidro. Após incubação em banho de água fervente, por 20 minutos, juntamente com os tubos da série padrão de lactose, os tubos eram resfriados em água corrente e agregados de 8,5 mL de água desionizada. Os valores de absorvância em 520 nm das soluções foram lidas, zerado com a solução do tubo branco da série padrão.

As concentrações de lactose das amostras de leite foram determinadas por interpolação matemática na equação de regressão da reta-padrão de lactose. Como as amostras de leite eram inicialmente diluídas de 100 para 250 µL de volume final, cada concentração de lactose obtida foi corrigida para esta diluição, utilizando o fator de correção de 2,5.

#### 4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS GLÂNDULAS MAMÁRIAS

Foi realizada a análise histológica das glândulas mamárias de ratas tratadas com a dose mais ativa de EEVO e de FD. No 20º dia, as ratas foram anestesiadas com ketamina (75 mg/ kg) e xilazina (10 mg/ kg), sendo decapitadas posteriormente. Três pares de glândulas mamárias (inguinal, abdominal e torácica) das ratas lactantes foram removidos e fixados imediatamente em solução a 10% de formalina neutra tamponada. Após a fixação, os espécimes foram desidratados por meio de imersão numa série de soluções de etanol e xileno em concentrações graduais e crescentes, sendo posteriormente embebidos em parafina e submetidos a secções de 5µm no bloco de parafina. Posteriormente, foi realizada a coloração das lâminas com hematoxilina e eosina.

Para o estudo histológico e morfométrico, foi feita a captura e digitalização de imagens das lâminas no formato TIFF, usando um microscópio binocular de luz Olympus<sup>®</sup> BX-51 (Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA) acoplado a uma câmera digital de captura (Olympus<sup>®</sup> SC30 - 3.3 megapixel CMOS, Japão), por meio do programa analySISgetIT (Olympus Soft Imaging Solution<sup>®</sup>).

Para o estudo histológico e morfométrico, foi feita a captura e digitalização de imagens das lâminas no formato TIFF. Uma lâmina de cada glândula será feita, e de cada lâmina foram captadas dez imagens de dez campos aleatórios, sendo escolhidos por sistema de varredura, a partir de cada uma das três zonas localizadas ao longo de um caminho imaginário orientado num eixo vertical, a partir do centro do mamilo para a margem esquerda e direita do tecido parenquimatoso adjacente. Foram escolhidos dez campos para cada aumento (4x, 10x e 20x), totalizando 30 imagens por lâmina/glândula para análise.

A análise histológica e morfométrica foi realizada com o auxílio do programa ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Estruturas das glândulas mamárias foram identificadas. Foi realizada a quantificação manual com o auxílio da ferramenta ROI Manager do número de lóbulos, alvéolos, ductos e vasos sanguíneos por glândula (10 fotos /campos).

Também foi realizada a relação alvéolos-ducto de cada glândula. Para determinar a diferença citológica das células epiteliais alveolares secretoras, as células foram classificadas de acordo com o grau de diferenciação: Totalmente diferenciada (G3) - muitos vacúolos, núcleo redondo localizado na região basal, citoplasma abundante em relação ao núcleo, gotículas de gordura na região apical; Diferenciação intermediária (G2) – média quantidade de vacúolos, formato do núcleo mais irregular, e maior proporção nuclear do que citoplasmática; Pouca diferenciação (G1) – poucos ou nenhum vacúolo, poucas gotículas de gordura grandes e espalhadas pela célula, e área relativamente pequena de citoplasma. Além disso, também foram classificadas como involução quando observada a presença de células apoptóticas no epitélio ou no lúmen dos alvéolos, ou presença de tecido adiposo interlobular (AKERS, 2017).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROLACTINA E OCITOCINA SÉRICA, HIPOFISÁRIA E DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A dosagem das concentrações de PRL e ocitocina sérica, hipofisária e da glândula mamária de ratas tratadas com EEVO na dose de 50 mg/ kg foram realizadas. Doze ratas no

início da lactação, amamentando de sete a oito filhotes foram utilizadas nesse experimento. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais, sendo que o grupo 1 recebeu 0,4 mL de água destilada (n=6) e o grupo 2 recebeu EEVO 50 mg/kg (n=6). Os animais foram tratados sempre às 18h, por injeção via intraperitoneal.

As ratas foram sacrificadas no 21º de lactação. Às 11:30 h as ratas foram separadas de sua ninhada pelo período de 1h; às 12:30 h, retornaram à caixa onde puderam amamentar os filhotes durante 30 minutos. Às 13h, as ratas foram anestesiadas com uma mistura de ketamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e decapitadas em seguida. Após o sacrifício, foi feita a coleta de amostras de sangue e a retirada de uma glândula mamária torácica e da retirada hipófise. Após a coleta do sangue, as amostras foram centrifugadas (1500 x g por 15 min a 4 °C) e o plasma estocado a -70 °C para a posterior análise. A hipófise foi armazenada em um eppendorf a -70 °C e a glândula mamária foi armazenada em tubo falcon, também a -70 °C, com PBS pH 7,4; 0,03 M; e 10 µL do homogeneizado foi diluído em tampão fosfato a 1% de BSA e armazenado a -70 °C (LOMPO-OUEDRAOGO; HEIDE, 2004).

As amostras de plasma, da hipófise e da glândula mamária torácica foram analisadas por reação imunoenzimática (ELISA). A dosagem de PRL foi realizada utilizando o kit da Molecular Innovations<sup>®</sup> (rat prolactin antigen assay) e a dosagem de ocitocina foi realizada utilizando o kit Phoenix Pharmaceuticals<sup>®</sup>, Inc. (oxytocin human, rat, mouse), seguindo o protocolo do fabricante. Os resultados foram expressos em ng/mL.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism*<sup>®</sup> versão 5.00 (GraphPad<sup>®</sup>, La Jolla, CA92037, USA) e apresentados como média ± erro padrão da média. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias, foi utilizado o teste One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Dunnet. Nos resultados analisados entre dois grupos, foi utilizado o teste *t-student*. O nível de significância adotado foi de 5%.



## CAPÍTULO 1

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GALACTAGOGA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Valeriana officinalis* LINN E DA SUA FRAÇÃO DICLOROMETANO, EM MODELO EXPERIMENTAL COM RATAS**

## Evaluation of galactagogue activity of ethanolic extract of *Valeriana officinalis* Linn and its dichloromethane fraction, in an experimental model with rats

Ana Marques Botelho<sup>1</sup>; Manoela Rios Trindade Carneiro<sup>1</sup>; Mariluze Peixoto Cruz<sup>1</sup>; Regiane Yatsuda<sup>1\*</sup>

1 Multidisciplinary Institute for Health, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, Bahia State, Brazil

Corresponding author: Regiane Yatsuda  
E-mail: [reyatsuda@yahoo.com](mailto:reyatsuda@yahoo.com)

### Abstract

**Purpose:** *Valeriana (Valeriana officinalis L.)* is a medicinal plant known for its sedative properties, which is why it is commonly used by lactating women as an alternative to treat anxiety states, common during breastfeeding. Thus, it was evaluate the galactagogue activity of the ethanolic extract of *V. officinalis* (EEVO) and the ethanolic extract of its dichloromethane fraction (EEFD), in an experimental animal model.

**Methods:** During 17 days, lactating Wistar rats were treated during by means of intraperitoneal injection with 0.2 ml of distilled water, group 1, EEVO in doses 12.5; 25, 50; 100 and 200 mg / kg per day, groups 2, 3, 4.5 and 6, respectively and EEFD at doses 25 and 50 mg / kg, groups 7 and 8, respectively. Daily and total weight gain of the litter, estimate of milk production, biochemical composition of the milk, histological analysis of the mammary glands (inguinal, thoracic and abdominal) and serum, pituitary and prolactin concentration in the mammary gland were evaluated.

**Results:** The group treated with EEVO 50mg/kg obtained the best results for daily weight gain (17%) and total pups (12%) ( $p > 0.05$ ). It also showed an increase in the concentration of proteins (30.57%) and total triglycerides (27.9%) in milk ( $p > 0.05$ ), as well as higher concentrations of serum prolactin and in the mammary gland ( $p > 0.05$ ). There were no differences in oxytocin levels ( $p > 0.05$ ). In addition, a decrease in alveolar epithelial cells in the involution phase was observed (37.8%) ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** Valerian has demonstrated a great potential to be used as a galactagogue substance. However, further studies should be done to justify its safe use by lactating women and for the further development of a lactogenic herbal medicine.

**Keywords:** Valerian, hypogalactia, milk, rats, milk, galactagogue.

## Introduction

Breastfeeding provided exclusively until the age of six months and continued for up to two years or more, together with the gradual insertion of complementary feeding, is one of the most effective practices to promote health and well-being to the child (1). This type of nutrition offers several short and long term benefits for both the baby and the lactating mother (2). Breastfeeding also has economic implications and the increase in its prevalence

is associated with a significant reduction in preventable hospital admissions and medical care costs for both the child and the mother (3)

Hypogalactia, characterized by low production of breast milk, is often the main reason for early weaning (4), with several reasons for this insufficient production, ranging from emotional situations of anxiety and stress, premature birth and mother-baby separation (5), even endocrine disorders such as hypothyroidism, obesity, diabetes and polycystic ovary syndrome (6).

Many mothers use galactagogues to increase breast milk production. Galactagogues are medicinal plants, medicines or foods used to facilitate the initiation, maintenance or increase the production of breast milk (5,7). Synthetic galactagogues like metoclopramide, domperidone, chlorpromazine and sulpride have several side effects in mothers and babies (8).

Valeriana (*Valeriana officinalis* L.), of the Valerianaceae family, is a plant native to North America, Asia and Europe. Valerian root is one of the most widely used herbal medicines to treat insomnia due to its sedative and hypnotic properties, but also used as an anxiolytic for its calming effects (9,10). Due to its mild sedative action, valerian is commonly used by lactating women to treat common postpartum disorders such as anxiety, insomnia and depression, replacing stronger sedatives such as benzodiazepines (11–13). Stress is an inhibitory factor in the release of oxytocin by the neurohypophysis, which can decrease milk production during breastfeeding (14,15). Despite its use by breastfeeding women and its calming action, there are no studies evaluating the influence of valerian on the production of breast milk.

Thus, the general objective of this work was to evaluate the galactagogue activity of the ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. roots and its dichloromethane fraction, in an experimental animal model. Parameters related to litter weight gain, estimated milk production, breastfeeding time, weight of lactating rats, milk composition, histological characteristics of the mammary glands and physiological concentrations of prolactin and oxytocin were determined.

## **Materials and methods**

### **Preparation of extracts**

Valerian roots were purchased from distributor Nutri Ervas®, (Lot 071300). The material was subjected to maceration with absolute ethanol, for 72 hours, protected from light and at ambient temperature. Then, the extract was filtered and concentrated on a rotary evaporator to eliminate ethanol, thus providing the dry ethanolic extract. A portion of the ethanolic extract was diluted in 10% ethanol and 90% distilled water (v/v), providing the ethanol extract of *V. officinalis* L. (EEVO). The remainder of the dry ethanolic extract was subjected to fractionation by liquid-liquid extraction using solvents with an increasing polarity gradient, gave rise to the fractions of hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol that were concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure until total elimination of solvents (16). The dichloromethane fraction was subsequently diluted in 10% ethanol and 90% distilled water, providing the dichloromethane fraction (EEFD).

### **Preliminary phytochemical analysis by slight layer chromatography**

Phytochemical analyses enable the qualitative disclosure of the different classes of secondary metabolites present in the plant extract, such as polyphenols, tannins, saponins, flavonoids, steroids and alkaloids (17–19) for analysis by thin layer chromatography (CCD) following the methodology described by (16).

### **Phytochemical analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry**

Analyses by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-EM) were performed in a Shimadzu QP2010SE (GC2010 Plus) apparatus using a fused silica capillary column Rtx-5MS (30 m; 0.25 mm internal diameter; 0.25  $\mu$ m) and helium as carrier gas. The extracts were analysed by gas chromatography coupled to a mass detector (CG-EM). Before being analysed by gas chromatography, the samples were subjected to derivatization by silylation.

For this analysis, 2 mg of each sample of the ethanolic extract and fraction of dichloromethane were weighed in a vial, where they were diluted in 60  $\mu$ L of pyridine. To this solution were added 100  $\mu$ L of the reaction mixture of N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) containing 1% trimethylchlorosilane (TMCS) (Sigma-Aldrich®). This mixture was heated at 70 ° C for 30 minutes in a water bath and, subsequently, 1  $\mu$ L of each mixture was injected into the CG-EM, in separate applications (20).

The temperature used in the analysis in the injector, detector and interface of the CG-EM system was 290 °C. The initial temperature of the analysis was 80 °C for 5 min, increasing from 285 °C to 4 °C/min. The final temperature remained at 285 °C for 40 minutes (20). The mass detector operated with electron impact ionization (70 eV) and mass scanning between 30 to 600 Da. The identification of the compounds was carried out by comparing the mass spectra of the samples, with those existing in the bank device data (NIST 08, FFNSC1.3 and WILEY8).

### **Animals**

Wistar rats (250–300 g) were maintained in a temperature-controlled room (22±2 °C) with controlled humidity (50–70%) and a 12 h light/dark cycle. The animals were kept in polypropylene boxes containing wood shavings at the base of the box with free access to food (Labina®, Purina) and filtered water. The estrous cycle was determined by vaginal lavage of all female rats. Vaginal fluid was collected with a plastic pipette containing one drop of saline solution that was injected, aspirated and placed on the slide for microscopic viewing. Females were housed for breeding after identifying the proestrus or estrous phase. Animal care and research protocols were in accordance with the principles and guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Federal University of Bahia, with protocol number 063/2018.

### **Extracts application**

The experiments were started on the day of the pups' birth. One day after delivery, the number of pups was adjusted, being four males and four females with similar weight for each lactating rats. From the third day of experiment, all pregnant rats were treated daily by intraperitoneal injection with 0.2 ml of distilled water, group 1 (n=8), EEVO in doses 12.5; 25, 50; 100 and 200 mg/kg per day, groups 2, 3, 4.5 and 6 (n=8), respectively and EEFD at doses 25 and 50 mg/kg, groups 7 and 8, respectively (n=8). All pregnant rats were treated for 17 days of lactation.

### **Evaluation of milk yield and the influence of ethanolic extract and dichloromethane fraction on the pup's growth**

The lactating rats and pups were weighed at the 4<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup>, 16<sup>o</sup> and 18<sup>o</sup> day of lactation using a precision analytical electronic balance. During the experiment, the pups were weighed at 12h (P1) and subsequently isolated from their mothers for 4 hours, between 12h and 16h, and weighed again at 16h (P2). Soon after, the pups returned to their mothers being allowed to breastfeed for one hour. The behaviour of the mothers during lactation was observed. After one-hour breastfeeding period, the pups were weighed (P3) and returned to their mothers until the next weighing. The mothers were weighed on the same days as the pups before and after breastfeeding period. The milk production during the 1-hour breastfeeding period was estimated by the difference in the weight of the pups from (P3) and (P2), and this value was corrected by the metabolic weight loss of the pups due to processes such as respiration, defecation and urinary loss following the formula:  $\frac{P1-P2}{4} + (P3-P2)$ . The daily weight gain of the pups was calculated by the difference in weight between the weights obtained by P1, divided by the number of days between the weighing intervals. The total weight gain during the whole experiment was calculated by P3 of the 18<sup>th</sup> day minus P1 of the 4<sup>th</sup> day of life of the pups.

### **Composition of milk**

On the nineteenth day of the experiment, milk was collected to analyse the biochemical composition. Before the milk collection started, the lactating rats were separated from the pups for two hours and after this period they return to their mothers for thirty minutes. Subsequently, the lactating rats were anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) by intraperitoneal injection. After the anesthetic effect started, oxytocin (0.5 IU/ rat, Syntocinon® Sandoz, Brazil) was injected intraperitoneally to stimulate milk flow. Milk samples were obtained by manual compression of the rat's nipples. Drops were collected with the aid of micropipettes and emptied in polypropylene eppendorf tubes. The collected samples were kept at - 70 ° C for further analysis of the milk constituents. The milk collection time for each lactating rat was approximately 30 min and milking always happened at 1 pm, to minimize possible daytime variations in the composition of the milk (21).

The biochemical measurements of total proteins, total lipids, lactose, triglycerides and cholesterol in milk samples from lactating rats and pups were performed by spectrophotometry in an automated analyser of the brand Mindray® model BS-120. For the analyses it was necessary to perform the dilution of the milk in the ratio 1: 5 for the dosages

of total proteins and cholesterol, 1:20 for the dosage of triglycerides and 1:15 for the dosages of lactose, being the absorbance values found passed by correction due to this dilution. Levels of total proteins, triglycerides, cholesterol and lactose were measured by colorimetric method (22,23). Milk was diluted 1:5 ratio for total protein and cholesterol determination, 1:20 for the determination of triglycerides and 1:15 for the determination of lactose. The total milk proteins, triglycerides and cholesterol were quantified using the Labtest ® commercial kit, the results were expressed in g/L. Lactose content was determined using the colorimetric method based on the reaction with picric acid (24,25). The lactose concentrations of the milk samples were determined by the regression equation of standard line (24,25).

### **Histological analysis of mammary glands**

Histological analysis of mammary glands was done as described by Messias et al. (2018). On the 20<sup>th</sup> day, the rats were anesthetized with ketamine (75 mg / kg) and xylazine (10 mg / kg), being subsequently decapitated. The mammary glands cervical, abdominal and inguinal from each rat were removed and fixed immediately in 10% neutral buffered formalin solution. After fixation, the glands were dehydrated by immersion in a series of ethanol and xylene solutions in gradient and increased concentrations, and then embedded in paraffin. Sections of 5 µm were made in the paraffin block. Subsequently, the glands were stained with hematoxylin-eosin. For the histological and morphometric study, the images were captured and digitized from the slides in the TIFF format, using an Olympus ® BX-51 binocular light microscope coupled to an Olympus SC30 digital capture camera – 3.3 megapixels CMOS, by AnalySISgetIT program. A slide of each gland was made, and from each slide ten images of ten random fields were chosen by scanning system, from each of the three zones located along an imaginary path oriented on a vertical axis, from the center of the nipple to the left and right margin of the adjacent parenchymal tissue. Ten fields were selected for each power view (4 ×, 10 × and 40 ×), totaling 30 images per slide/gland for analysis. Histological and morphometric analysis was done with ImageJ 1.46r program. Structures of the mammary glands were identified and the manual quantification with the ROI Manager tool was done for lobules, alveoli, ducts and blood vessels per gland. To determine the cytological differences of the secretory alveolar epithelial cells, the cells were classified according to degree of differentiation: Fully differentiated (G3)—many vacuoles, round nucleus located in the basal region, abundant cytoplasm relative to the nucleus, fat

droplets in the Apical region; Intermediate differentiation (G2)— medium amount of vacuoles, more irregular nucleus shape and higher nuclear proportion than cytoplasmic; Poorly differentiation (G1) - few or no vacuoles, few large droplets of fat scattered throughout the cell and relatively small area of cytoplasm (26). In addition, they were also classified as involution when observed the presence of apoptotic cells in the epithelium or lumen of the alveoli (26).

### **Statistical analysis**

The data was analysed using *GraphPad Prism*<sup>®</sup> version 5.00 (GraphPad<sup>®</sup>, La Jolla, CA92037, USA) and presented as mean  $\pm$  standard error of the mean. For variables that followed non-normal distribution and homogeneity of variance, the Mann Whitney test was used. For variables that followed normal distribution and homogeneity of variance it was used unpaired t test or Oneway ANOVA. When ANOVA resulted in differences, multiple comparisons among means were studied by Tukey HSD. The significance level was 5%.

## **Results**

### **Extract and fractions yield**

The ethanolic extract of the roots and rhizomes of *V. officinalis* L. was concentrated, obtaining the ethanolic extract, with a yield of 4.05% in relation to the weight of roots and rhizomes of the dry plant (Table 1). Then, 20 g of ethanolic extract was subjected to extraction by partition, following an increasing gradient of polarity. After evaporation, the four fractions were obtained with the following yields: 51.12% (hexane), 13.40% (dichloromethane), 4.37% (ethyl acetate) and 11.23% (butanol); in relation to the weight of the ethanolic root and rhizome extract.



Table 1 - Yield of extract and fractions (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol) obtained from roots and rhizomes of *Valeriana officinalis* L.

Extract / fraction	Yield (%)
Ethanolic extract	4.05
Hexane	51.12
Dichlorometane	13.40
Ethyl acetate	4.37
Butanol	11.23

### Phytochemical analysis by CCD

Phytochemical analyzes enable the qualitative determination of different classes of secondary metabolites present in a sample. The analyzes for polyphenols, saponins, alkaloids, phenolic acids, flavonoids and steroids from the fractions of the ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol) were performed (Table 2) and the visualized results are described in Figure 1.

All fractions, with the exception of hexane, tested positive for polyphenols, with the appearance of greenish spots. Likewise, the dichloromethane, ethyl acetate and butanol fractions indicated the presence of alkaloids, with reddish-brown spots, with the exception of the hexane fraction. All fractions tested positive for saponins, through the appearance of eggplant purple spots. Only the ethyl acetate fraction indicated the presence of tannins, with the appearance of greenish spots. Only the hexane and dichloromethane fractions tested positive for steroids, through the appearance of purple spots. Dichloromethane and ethyl acetate tested positive for flavonoids, through the appearance of fluorescent green spots. Only butanol tested positive for phenolic acids, through the appearance of fluorescent blue spots.

Table 1 - Preliminary phytochemical analysis of the fractions of the ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L.

Compounds identified	Fractions of <i>Valeriana officinalis</i> L.			
	Hexane	Dichloromethane	Ethyl acetate	Butanol
Polyphenols	-	+	+	+
Saponins	+	+	+	+
Tannins	-	-	+	-
Flavonoids	-	+	+	-
Phenolic acids	-	-	-	+
Steroids	+	+	-	-
Alkaloids	-	+	+	+

(+) positive result. (-) negative result.

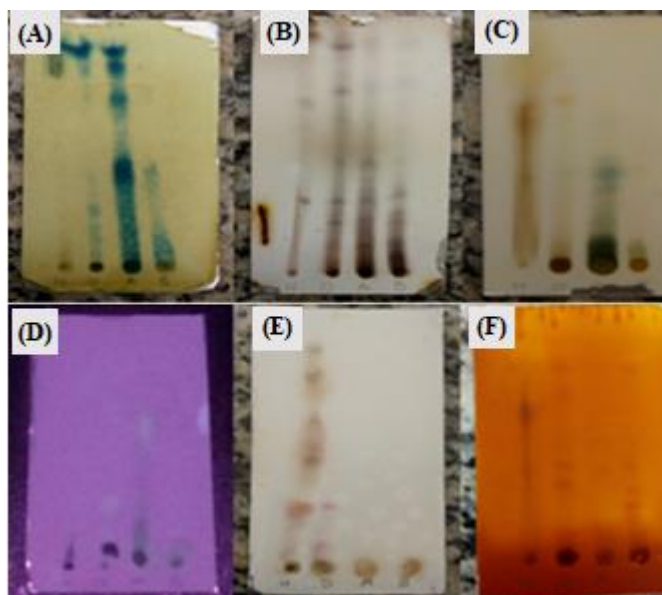


Figure 1 - Chromatographic plates submitted to phytochemical analysis by CCD for polyphenols (A), saponins (B), tannins (C), flavonoids (D), phenolic acids (D), phytosterols (E) and alkaloids (F) from *Valeriana officinalis* L.

### Phytochemical analysis by CG-MS

The ethanolic extract and the dichloromethane fraction were analyzed by gas chromatography coupled to a mass detector (CG-EM). The identified substances are shown in Table 3.

Table 2 - Chemical components (expressed in% of relative area) of the ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. and its dichloromethane fraction

Retention time (min)	Compounds	Ethanolic Extract	Dichloromethane
4638	Ethylene glycol	-	0.06
5924	Caproic acid	-	0.68
6315	2,3-dihydroxybutane	-	1.26
6944	Lactic acid	0.44	0.36
9465	2-Methyl-2-hydroxybutanoic acid	-	0.99
10594	3-Methyl-2-hydroxybutanoic acid	0.14	1.06
12143	3-Methyl-3-hydroxybutanoic acid	0.20	1.51
13276	Benzoic acid	-	0.26
13484	Succinate acid monoethyl ester	-	2.58
14714	Glycerol	3.4	0.16
15808	Butanedioic acid	-	0.31
16604	Glycolic acid	0.38	-
16654	Tartaric acid	1.75	1.05
19985	3,4-dihydroxybutanoic acid	-	0.16
21748	Malic acid	0.99	2.20
22544	Pyroglutamic acid	1.80	-
27988	Valerenal	0.54	-
34810	Ethyl hexadecanoate	0.50	0.16
36092	Palmitic acid	5.92	-
36990	4-Methoxy-3-hydroxycinnamic acid		2.20
38446	Ethyl linoleate	1.04	-
39738	Linoleic acid	10.56	-
39893	Linolenic acid	3.66	-
58829	Beta-sitosterol	2.48	-
	<b>Identified</b>	31.71	13.77
	<b>Carbohydrates</b>	47.78	24.40
	<b>Not identified</b>	20.51	61.84

### **Evaluation of milk yield and the influence of ethanolic extract on the pups growth**

The evaluation of the daily and total weight gain of the pups, as well as the mother's weight loss during the experiment were evaluated (Table 4). In relation to daily and total weight gain, pups of mothers treated with EEVO at dose of 25 mg/kg showed a significant increase in the average daily weight gain ( $1.89 \pm 0.36$  g) and total ( $28.50 \pm 1.73$  g) when compared to the control group ( $1.68 \pm 0.47$  g and  $23.47 \pm 2.79$  g, respectively) ( $p < 0.05$ ). In addition, pups of mothers treated with EEVO at doses of 50 mg/kg showed a significant increase in average daily weight gain ( $1.87 \pm 0.45$  g) and total ( $27.30 \pm 1.98$  g) in compared to the group treated with distilled water ( $p < 0.05$ ).

The group of pups treated with FD at dose of 25 mg/kg did not show a significant increase in the average daily weight gain in relation to the control ( $p > 0.05$ ), while the group of pups of mothers treated with 50 mg/kg ( $1.73 \pm 0.59$  g) showed significant increase in the average daily weight gain when compared to the control group ( $p < 0.05$ ). Regarding the averages of total weight gain, the two doses of 25 and 50 mg/kg showed a significant increase compared to the control group ( $25.89 \pm 1.95$  g and  $26.55 \pm 1.90$  g, respectively) ( $p < 0.05$ ).

Regarding the average variation in the weight of lactating rats, none of the groups treated with the different doses of EEVO showed a statistically significant difference compared to the average weight loss of the control group ( $p > 0.05$ ). Only the group treated with FD at a dose of 50 mg/kg showed a significant decrease in weight of lactating rats compared to the control ( $p > 0.05$ ).

Table 3 - Effect of ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. and dichloromethane fraction and the influence on daily and total weight gain, estimated milk production, breastfeeding time and weight loss in lactating rats in 19 days of treatment.

Groups	Influence of EEVO on the weight of mother and pups (g)		
	Daily weight gain of pups	Total weight gain of pups	Lost weight of mother
Control	1.45 ± 0.58	23.75 ± 2.82	-9.35 ± 1.46
EEVO 12.5 mg/kg	1.54 ± 0.38*	22.13 ± 2.54	-8.18 ± 4.63
EEVO 25 mg/ kg	1.89 ± 0.36*	28.50 ± 1.73*	-6.85 ± 5.65
EEVO 50 mg/ kg	1.87 ± 0.45*	27.30 ± 1.98*	-9.12 ± 5.49
EEVO 100mg/ kg	1.79 ± 0.32	25.12 ± 0.92	-8.98 ± 3.94
EEVO 200 mg/kg	1.78 ± 0.24	25.59 ± 1.04	-10.10 ± 4.69
DF 25 mg/kg	1.62 ± 0.68	25.89 ± 1.95*	-9.42 ± 1.53*
DF 50 mg/kg	1.73 ± 0.59*	26.55 ± 1.90*	-11.02 ± 1.94*

Values expressed as mean ± standard deviation, based on n = 6, with 8 pups per litter. \* They present a statistically significant difference in relation to the control group (distilled water) (p <0.05). Kruskal-Wallis followed by Dunnett's multiple comparison post-test. EEVO: ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. DF: dichloromethane fraction.

The estimate of milk production in 1 hour was also evaluated (Table 5). No group treated with the different doses of EEVO or DF showed a significant increase in the average milk production estimate when compared to the control group, treated with distilled water (p > 0.05). As for the average breastfeeding time during the 1-hour period, no significant difference was found between the groups treated with EEVO and FD compared to the negative control group, treated with distilled water (p > 0.05).

Table 5 - Effect of ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. and dichloromethane fraction and the influence on estimated milk production and breastfeeding time in lactating rats in 19 days of treatment.

Groups	Estimate of milk production in 1 hour (g)	Breastfeeding time (min)
Control	0,50 ± 0,69	40,89 ± 9,05
EEVO 12.5 mg/kg	0,58 ± 0,60	50,64 ± 4,97
EEVO 25 mg/ kg	0,64 ± 0,59	43,89 ± 5,73
EEVO 50 mg/ kg	0,55 ± 0,49	47,88 ± 4,61
EEVO 100mg/ kg	0,63 ± 0,32	42,33 ± 8,93
EEVO 200 mg/kg	0,63 ± 0,31	39,00 ± 11,47
DF 25mg/kg	0,55 ± 0,59	43,89 ± 5,38
DF 50mg/kg	0,59 ± 0,47	44,50 ± 3,12

Values expressed as mean ± standard deviation, based on n = 6, with 8 pups per litter. \* They present a statistically significant difference in relation to the control group (distilled water) (p <0.05). Kruskal-Wallis followed by Dunnett's multiple comparison post-test. EEVO: ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. DF: dichloromethane fraction.

During this breastfeeding period, the mothers' behavior and the appearance of possible toxic effects of the ethanolic extract were also observed, through the observation of the presence of piloerection, alteration of the locomotor activity, diarrhea, breastfeeding posture, organization and maintenance of the nest, collect and lick the pups, and deaths. However, no changes were observed during the EEVO and FD experiment at any of the doses tested (data not shown).

### Results for analysis of milk composition

The concentration of the major constituents of the milk of rats treated with the most active doses of EEVO (25 and 50 mg/kg) and dichloromethane fraction (25 and 50 mg/kg) was evaluated (Table 6). There was a significant increase in the mean total protein concentration in the groups treated with EEVO at doses of 25 and 50 mg/kg when compared to the control group (p <0.05). Likewise, the average concentration of triglycerides in the milk of the groups treated with EEVO at doses of 25 and 50 mg/kg was significantly higher when compared to the group treated with distilled water (32.32 ± 6.47 g/L) (p < 0.05).

Through the analyzes performed, a significant increase in the average concentration of total proteins and triglycerides in milk in the group treated with FD at the dose of 25 and 50 mg/kg when compared to the group treated with distilled water (p < 0.05).

The concentration of milk cholesterol showed no statistical difference in the means of test groups when compared to the control group ( $p > 0.05$ ). Likewise, no significant changes in the average lactose concentration of milk were demonstrated for the groups treated with EEVO and FD compared to the group treated with distilled water ( $p > 0.05$ ).

Table 6 - Concentration of the major constituents of the milk of rats treated with ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. and dichloromethane fraction.

Groups	Composition of milk			
	Total proteins (g/L)	Total triglycerides (g/L)	Total cholesterol (g/L)	Total Lactose (g/L)
Control	236.75 ± 30.18	32.32 ± 6.47	1.17 ± 0.35	31.56 ± 4.76
EEVO 25mg/Kg	307.5 ± 92.72*	37.20 ± 6.06*	1.21 ± 0.39	28.91 ± 4.94
EEVO 50mg/Kg	309.2 ± 87.1*	41.35 ± 2.89*	1.16 ± 0.23	30.44 ± 3.56
FD 25mg/Kg	419.8 ± 68.97*	117.4 ± 30.04*	1.19 ± 0.40	28.48 ± 3.39
FD 50mg/Kg	446.8 ± 59.92*	126.7 ± 10.50*	1.20 ± 0.25	30.28 ± 1.64

Values are expressed as mean ± standard deviation, based on  $n = 6$ , with 8 pups per litter. \* They present a statistically significant difference in relation to the control group (distilled water) ( $p < 0.05$ ). Kruskal-Wallis followed by Dunnett's multiple comparison post-test. EEVO: ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. DF: dichloromethane fraction.

#### **Histological parameters of the breast glands of rats treated with the most active ethanolic extract doses of *Valeriana officinalis* L. dichloromethane fraction.**

The histological parameters of the mammary glands of rats treated with doses of 25 and 50 mg/kg of EEVO and FD were evaluated (Table 7). With regard to the average number of alveoli per mammary gland, the groups treated with EEVO at the dose of 25 and 50 mg/kg ( $18.81 \pm 0.70$ ) did not show statistical difference in relation to the control group, treated with distilled water ( $18, 08 \pm 2.77$ ) ( $p < 0.05$ ). In contrast, the mean lobes per mammary gland were higher for the groups treated with EEVO at the dose of 25 and 50 mg/kg ( $10.67 \pm 0.53$ ) compared to the control group ( $9.85 \pm 0.77$ ) ( $p < 0.05$ ).

Regarding the mean number of alveoli per mammary gland, only the group treated with FD at a dose of 50 mg/kg had higher means compared to the control ( $p < 0.05$ ). In relation to the average lobules per mammary gland, only the group treated with FD 50 mg/kg

showed a higher average compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The group treated with FD 25 mg/kg showed mean alveoli and lobes similar to the control ( $p > 0.05$ ).

Only the group treated with EEVO at a dose of 50 mg/kg showed a significant increase in the mean number of blood vessels per mammary gland ( $4.95 \pm 0.33$ ) compared to the control group ( $3.89 \pm 0.76$ ) ( $p < 0.05$ ). Regarding the average ducts and the alveolus-duct ratio per mammary gland, the doses of 25 and 50 mg/kg did not show any significant difference in relation to the control group ( $p > 0.05$ ).

The groups treated with FD at doses of 25 and 50 mg/kg showed an average of blood vessels and ducts per mammary gland in relation to the control group ( $p > 0.05$ ). Finally, the alveolus-duct ratio of the glands of the FD groups at doses of 25 and 50 mg/kg did not show any significant difference in relation to the control group ( $p > 0.05$ ).

Table 7 – Histological parameters of the mammary glands of rats treated with the ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. and dichloromethane fraction.

Groups	Components of the mammary glands				
	Alveoli/MG	Lobules/MG	Blood vessels /MG	Ducts/MG	Alveoli/ducts
Control	$18.08 \pm 2.77$	$9.85 \pm 0.77$	$3.89 \pm 0.76$	$1.59 \pm 0.06$	$11.42 \pm 1.92$
EEVO 25mg/Kg	$18.67 \pm 1.72$	$10.82 \pm 0.58^*$	$3.45 \pm 0.26$	$1.60 \pm 0.13$	$11.58 \pm 1.11$
EEVO 50mg/kg	$18.81 \pm 0.70$	$10.67 \pm 0.53^*$	$4.95 \pm 0.33$	$1.64 \pm 0.04$	$11.45 \pm 0.41$
FD 25 mg/Kg	$17.90 \pm 1.38$	$10.13 \pm 0.45$	$3.78 \pm 0.17$	$1.60 \pm 0.11$	$11.21 \pm 1.07$
FD 50 mg/kg	$19.29 \pm 1.33^*$	$10.71 \pm 0.59^*$	$3.85 \pm 0.35$	$1.62 \pm 0.06$	$11.96 \pm 0.83$

Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, based on  $n = 6$ , with 8 pups per litter. \* They present a statistically significant difference in relation to the control group (distilled water) ( $p < 0.05$ ). Kruskal-Wallis followed by Dunnett's multiple comparison post-test. EEVO: ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. DF: dichloromethane fraction.

Stages of alveolar differentiation in rats treated with the most active doses of EEVO and DF were evaluated (Table 8). Regarding the mean of alveolar cells in stage G1, only the group treated with EEVO 50 mg/kg showed a significant increase ( $44.50 \pm 5.21$ ) compared to the group treated with distilled water ( $35.67 \pm 6.81$ ) ( $p < 0.05$ ). Regarding the average of alveolar cells in the intermediate differentiation stage (G2), a significant increase was observed for the groups treated with EEVO at doses of 25 and 50 mg/kg compared to the control group ( $p < 0.05$ ). No fully differentiated cells (G3) were observed in any of the EEVO and control groups tested. EEVO at doses of 25 and 50 mg/kg demonstrated a significant



decrease in the mean of involution cells compared to the control group ( $p < 0.05$ ). Thus, it can be said that EEVO at doses of 25 and 50 mg/kg showed a delay in the alveolar involution process by approximately 50%.

Regarding the mean of alveolar cells in stage G1, none of the groups treated with DF showed a significant increase compared to the control group ( $p > 0.05$ ). Regarding the average of alveolar cells in G2 (intermediate differentiation), a significant increase for the group treated with FD at a dose of 25 mg/kg compared to the control group was observed ( $p < 0.05$ ). The group treated with the 50 mg/kg dose did not differ from the control mean for alveolar cells in the intermediate differentiation stage ( $p > 0.05$ ). No fully differentiated alveolar cells (G3) were found in any of the FD dosages and in the control group. As for cells in involution, FD at doses of 25 and 50 mg/kg showed averages similar to the control group ( $p > 0.05$ ).

Table 8 - Differentiation stages of alveolar epithelial cells of rats treated with the most active doses of ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. and dichloromethane fraction.

Groups	Cell differentiation stage			
	G1 (Poorly differentiated)	G2 (intermediate differentiation)	G3 (fully differentiated)	Involution
Control	35.67 ± 6.81	12.00 ± 5.88	-	12.33 ± 6.34
EEVO 25mg/kg	31.83 ± 7.45	21.33 ± 5.99*	-	6.83 ± 7.59*
EEVO 50mg/kg	44.50 ± 5.21*	27.83 ± 4.45*	-	7.67 ± 2.81*
FD 25mg/kg	36.00 ± 5.97	17.67 ± 4.14*	-	10.17 ± 2.04
FD 50mg/kg	37.00 ± 2.95	16.67 ± 2.57	-	9.33 ± 1.88

Data presented as an average percentage of the four differentiating classes of mammary glands treated with distilled water and EEVO at doses of 25 and 50 mg/kg. Group of rats (n = 6). EEVO: ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. DF: dichloromethane fraction. (-) did not have fully differentiated cells.

### Concentration of prolactin and serum, hypophysial and occupancy in the breast gland

The PRL concentration in samples of adenohipophysis, serum and thoracic mammary gland from rats treated with EEVO 50 mg/kg was evaluated (Table 9). The mean PRL concentration in the adenohipophysis of rats treated with EEVO 50 mg/kg did not show any significant difference in relation to the control group treated with distilled water ( $p >$

0.05). Regarding the average PRL levels in the serum and in the mammary gland, lactating rats treated with EEVO 50 mg/kg showed a significant increase in relation to the control group ( $p < 0.05$ ).

Table 9 - Concentration of prolactin in samples of adenohypophysis, serum and thoracic mammary gland of rats treated with ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L.

Groups	Prolactin concentration (ng/mL)		
	Adenohypophysis	Serum	Mammary gland
Control	19.46 ± 20.12	5.16 ± 2.55	6.50 ± 1.34
EEVO 50 mg/kg	22.14 ± 16.63	7.40 ± 1.55*	8.18 ± 2.32*

Values expressed as mean ± standard deviation. \* They present a statistically significant difference in relation to the control group (distilled water) ( $p < 0.05$ ). One-Way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post-test. Control: 0.4 mL of distilled water. EEVO: ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. (50 mg/kg).

Rats treated with EEVO 50 mg/kg demonstrated a significant decrease in the mean concentrations of neurohypophysis and plasma oxytocin compared to the negative control ( $p < 0.05$ ), as described in Table 10. Oxytocin concentrations in the mammary gland samples were not detectable by the immunoenzymatic reaction kit (ELISA) used.

Table 10 - Oxytocin concentration in samples of neurohypophysis, serum and thoracic mammary gland from rats treated with ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. (50 mg/kg).

Groups	Concentrations of oxytocin (ng/mL)		
	Neurohypophysis	Serum	Mammary gland
Control	0.68 ± 0.04	8.32 ± 1.16	6.5 ± 1.4
EEVO 50mg/kg	0.26 ± 0.14*	3.13 ± 0.76*	-

Values expressed as mean ± standard deviation. \* They present a statistically significant difference in relation to the control group (distilled water) ( $p < 0.05$ ). One-Way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post-test. Control: 0.4 mL of distilled water. EEVO: ethanolic extract of *Valeriana officinalis* L. (50 mg/kg).

## Discussion

The root of *Valeriana officinalis* is the part of the plant that has the compounds responsible for its sedative and anxiolytic effects (9), consisting of more than 150 components already identified (28). Phytochemical analysis by CCD indicated the presence of saponins, flavonoids and phytosteroids in the ethanolic extract, and these classes of compounds have already been related to the galactagogue action of medicinal plants due to their estrogenic activity and, thus, modulate the production and release of prolactin. (29–32).

Despite the positive results for flavonoids and saponins by phytochemical analysis by CCD, such compounds were not identified both in the ethanolic extract and in the dichloromethane fraction in the GC-MS analysis. This may be due to the compounds being in a concentration not detectable by the chromatograph, or they were not identified by the program database used to read the chromatogram.

Steroids were identified in the ethanolic extract, and dichloromethane fraction by phytochemical analysis. In addition,  $\beta$ -sitosterol was also identified in the ethanolic extract by GC-MS analysis. Some studies report that these compounds have estrogenic effects because they act as partial agonists at the estrogen receptors ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  in the pituitary lactotrophic cells, activating the transcription of the PRL gene, and are therefore responsible for the galactagogue effect of some plants (30,34).

In this study, EEVO showed better galactagogue activity at doses of 25 and 50 mg/kg, observed by increasing the daily and total weight of the pups, in relation to the control group. After the positive galactagogue results obtained with EEVO, dichloromethane fraction was chosen for biological tests because of presence of saponins, flavonoids and steroids in the phytochemical study in CCD, and due to its polarity, it facilitated the application in the chromatograph to identify compounds. Saponins, flavonoids and steroids are chemical classes that can positively influence lactation.

The FD was tested in the same active doses of EEVO, 25 and 50 mg/kg, showing the best galactagogue result for the 50 mg/kg dose that showed the greatest daily and total weight gain, reflecting in the mother's greatest weight loss. Thus, in relation to total weight gain, EEVO at doses of 25 and 50 mg/kg promoted an increase of approximately 20% and 14.95%, respectively, compared to control, while FD at doses of 25 and 50 mg/kg showed an increase of approximately 9% and 11.79% in relation to the control. In relation to percentage of weight gain, the ethanolic extract showed better results than FD.

The growth and increase in pups weight gain is directly related to the volume of milk production and its composition (35). For this reason, several studies have used litter weight gain to assess milk production over the years (36–38). Thus, we can conclude that EEVO and FD, have galactagogue activity only by increasing the weight of the litter, even if the estimated hourly milk production is not increased. This evaluation in one-hour may not reflect the milk production produced throughout the day, thus, the litter's weight gain is a better indicator (38).

In a study by Hosseinzadeh (2013), using ethanolic extract of seeds of *P. anisum*, a significant increase in daily weight of 16.35% was also observed in the offspring of mothers treated with ethanolic extract at a concentration of 1 mg/kg, demonstrating the galactagogue activity of the plant. Mahmood et al. (2012), evaluated the effect of *Musa x paradisiaca* flowers extract on the galactagogue activity of lactating rats, and the total weight gain of 50.4% and 67.82% found in doses of 280 and 560 mg/kg, respectively, orally, in relation to the control.

The groups treated with EEVO (25 and 50 mg/kg) and FD (25 mg/kg) did not present significant mean weight loss in relation to the control, however they presented an increase in the total weight gain of the pups, as well as in the concentration of total triglycerides in the composition of milk (15.10%, 27.94% and 263.24%, respectively). Part of the increased demand for glucose and lipid components by the mammary gland can also be met by the increased food intake of the rat (39). Therefore, the increase in food intake during lactation as a result of high energy requirements associated with the milk synthesis process may have been offset by the increased consumption of feed offered *ad libitum*, with no need to mobilize the body fat reserve.

Only the treated group of lactating rats with FD at a dose of 50 mg/kg lost more weight than the other groups, a significant 17.9% increase in the average weight loss compared to the control group. Mammals can lose a significant amount of body fat to maintain the nutritional needs of their offspring and supply the high energy cost of lactation (40). This loss occurs through the mobilization of lipids from the adipose tissue, releasing unesterified triacylglycerides and fatty acids in the blood, these substrates being used for the synthesis of new lipids by the mammary gland (41). Thus, when dietary intake does not meet the nutritional requirements necessary for milk production, it is common for lactating rats to lose weight (39). Thus, this greater weight loss of lactating rats FD 50 mg/kg may be related

to an increase of approximately 292% in the concentration of total triglycerides in the milk of this group, which is not compensated or sufficient by the increased feed intake.

Finally, there was no difference in breastfeeding time for groups treated with EEVO and FD compared to the control group. These data are important, as they demonstrate that the differences obtained in relation to the pups' weight gain, dam's weight loss and milk production estimate are not due to longer breastfeeding between groups. A period of normal breastfeeding is also an important indicator that there were no behavioral changes in the mother during lactation (42).

In the present study, EEVO at doses of 25 and 50 mg/kg promoted a significant increase in the averages of total triglycerides (15.10 and 27.94%, respectively) and total proteins (30.30 and 31.02%). Similarly, FD at doses of 25 and 50 mg/kg promoted a significant increase in the averages of total triglycerides (263% and 292%) and total proteins (77.88 and 89.32%). None of the extracts and FD tested showed significant variation in the levels of lactose and total cholesterol in milk.

Several studies show the direct relationship between the concentration of components in rat milk and the growth of pups, with proteins and lipids being the components that have the greatest influence on this growth (36,44,46). Lipids are the macronutrients in greatest concentration in the milk of rats, being responsible for providing 50% to 60% of the total calories of milk, with 95% corresponding to triacylglycerols and the remainder to small amounts of diacylglycerol, phospholipids, non-esterified fatty acids, cholesterol and cholesterol esters (44).

Among the possible mechanisms of action of galactagogue substances, Rudolph and co-workers (2011) demonstrated that prolactin can induce the activation of the AKT pathway in the mammary gland, promoting greater synthesis of milk lipids. Milk proteins are also of great importance in the growth and development of rat pups (47). Tabares et al. (2014) report that galactagogues that act as dopaminergic antagonists, increase the release of prolactin, increase the rates of protein synthesis in milk. Thus, the significant increase in the average concentration of triglycerides and total proteins in the milk of rats treated with different doses of EEVO and FD corroborates the increase in total weight gain observed in the respective litters.

However, the much higher concentrations of triglycerides in the milk of the FD groups in relation to the EEVO group did not reflect proportionally to the total weight gain of the litter, which was even lower in the FD groups proportionally in relation to the EEVO

group. This high content of total lipids in milk may also have made it difficult for pups to suck milk, justifying the lack of connection between triglyceride concentration and total weight gain. According to Schwertfeger et al. (2003), the increase of 65 to 70% in the fat content of milk promoted a reduced growth of the litter, which was associated with the difficulty in removing adequate quantities of milk by the pups due to the increase in their viscosity.

Few studies have demonstrated the influence of galactagogue substances on the composition of milk macronutrients (49–51). Mills and Bone (2000) reported that the consumption of *Foeniculum vulgare* M., which contains galactagogues with estrogenic activity in its composition, increased milk production and the lipid content in goat's milk. Abdel-Rahman and collaborators (2016) evaluated the composition of lactating rabbit milk under the effect of fenugreek seeds, a plant used as a galactagogue, having obtained a higher concentration of fat, protein and total lactose.

The composition of milk can also be influenced by the appropriate development of alveolar cells (53,54). Increased amounts of lobules were observed with treatments of EEVO (25 and 50 mg/kg) and FD 50 mg/kg, and the number of wells increased with the treatment of FD 50 mg/kg. The synthesis of milk proteins can be synonymous with the adequate differentiation of secretory cells (55,56), as well as the increase in the number or activity of alveolar cells is associated with an increase in milk synthesis (57).

Just as milk production depends on the number of mammary epithelial cells, the secretory activity of these cells can also be assessed through the stage of alveolar involution (56,58,59). Regarding the stage of alveolar cells, a significant decrease of approximately 50% in the involution averages of the groups treated with EEVO was observed at doses of 25 and 50 mg/kg, respectively, compared to the control, demonstrating that these glands on the 19<sup>th</sup> day lactation, where weaning and involution of the gland usually occur, mostly continue with intermediate, active and secretory differentiation. Thus, treatments with EEVO and FD demonstrated a histologically more active and secretory gland, with better lactational performance.

A significant increase of approximately 12% in the mean of blood vessels in the EEVO 50 mg/kg group was observed in relation to the control group. The synthesis of milk constituents depends on the absorption of nutrients promoted by the blood flow around each alveolus (56,60). PRL promotes the expression of vascular endothelial growth factor

(VEGF) in mammary epithelial cells, promoting the expansion of the gland's vasculature and thus, offering conditions to maintain its intense metabolism during lactation (61).

In view of the results obtained in the different tests, it was necessary to evaluate the influence of EEVO on the concentrations of the two lactogenic hormones, prolactin and oxytocin. The serum, pituitary and mammary gland dosage of this hormone is considered an effective way to evaluate the performance of lactation and therefore some studies have used this parameter to analyze the galactagogue activity of drugs and medicinal plants (64–66). EEVO 50 mg/kg increased PRL concentrations by 43.41% in the serum and by 25.85% in the mammary gland. PRL acts on alveolar epithelial cells by stimulating the expression of genes involved in lactogenesis (67), stimulating the synthesis and secretion of the main constituents of milk, as well as maintaining the activity of breast alveoli (67,68).

PRL acts through a cytokine-type receptor (PRL-R) located on the cell surface, with the activation of the Janus kinase protein (JAK), triggering the phosphorylation of transcription factors from the STAT pathway (69). The Stat5 transcription factor activated by PRL is a central determinant of breast alveolar growth and differentiation, as well as for the survival of gland cells (68). In addition, PRL promotes the synthesis of proteins such as  $\beta$ -casein and enzymes necessary for the synthesis of lactose and triglycerides, involving quantitative and qualitative changes in the composition of milk (68,70,71). Thus, the result of increased levels of PRL in the serum and mammary gland of rats treated with EEVO justifies the increase in triglycerides and total milk proteins, as well as justifying the mammary gland with more active and secretory histological characteristics.

The main responsible for the increase in prolactin levels caused by EEVO may be the sterols identified by CCD. Phytoestrogens, such as  $\beta$ -sitosterol, induce biological responses that mimic the activity of endogenous estrogens by binding to their ER receptors (72,73). Estrogen is considered a positive regulator of pituitary prolactin secretion and acts to stimulate prolactin receptor synthesis. In addition, estrogen antagonizes the dopamine-inhibiting action on PRL secretion by reducing the ability of adenohypophyseal cells to incorporate dopamine into PRL-secreting granules (74). In addition to the actions described, estrogen also plays an important role in the development of the mammary gland in the postnatal period, coordinating proliferation and differentiation through paracrine interactions (75).

Studies by Badjudar (2015) evaluated the galactagogue activity of the aqueous extract of *Cyperus rotundus* Linn, and Lompo-Ouedraogo (2013) evaluated the galactagogue

activity of the ethanolic extract of *Acacia nilotica* ssp *adansonii* in lactating rats. In both studies, more numerous and active alveoli were observed in breast tissues treated with the extracts, and these effects were justified by the presence of estrogenic substances in plants, which act by increasing the release of PRL. Silva et al. (2017), demonstrated that the ingestion of the infusion of chamomile, with compounds similar to estrogen in low concentrations together with the abundant intake of water, may have been responsible for the stimulating effect of milk production, explaining in some way the effect chamomile galactagogue, but a synergistic effect may also be involved by inhibiting estrogen metabolism.

Phytosterols can also play a mixed agonistic / antagonistic activity on animal steroid receptors. Thus, although estrogen has a positive effect in promoting milk synthesis, higher doses may reduce the sensitivity of the mammary gland receptors to the action of prolactin, negatively interfering with milk production (33). Since no adverse toxicity effects were observed in animals treated with EEVO, the presence of  $\beta$ -sitosterol or phytosterols in ethanolic valerian extract may be the cause of the decrease in galactagogue activity in groups treated with higher doses of EEVO (100 and 200 mg / kg).

Due to its phytoestrogenic components, valerian is also recommended for the reduction of symptoms of menopause (76,77). Mirabi and Mojab (2013) demonstrated that 225 mg of Valerian root prescribed three times a day can be considered as a treatment of choice for reducing hot flashes among postmenopausal women who are reluctant to receive hormone therapy. A recent 8-week study of 60 postmenopausal women showed a significant improvement in menopausal symptoms in women who received 530 mg of valerian root capsules twice daily (76).

The serum levels of oxytocin are related to the volume of milk produced, and its synthetic form is used as a galactagogue in women who present hypogalactia (81). Treatment with exogenous oxytocin is also associated with increased milk production in other mammals (80,82–84). The levels of oxytocin in the neurohypophysis and in the serum of rats treated with EEVO 50 mg/kg were lower than those in the control group. There may have been a flaw in the analysis of the quantification of oxytocin explained by its short half-life, or there really was this reduction that may have occurred due to decreased suction stimulation of the pups. The immunoassay method used in this study, despite being one of the most used, still has many limitations that may have influenced the results found (85).



Stress is an inhibitory factor in the release of oxytocin by the neurohypophysis, which may decrease milk production during breastfeeding (15,86). Some studies indicate that stressors in lactating women are associated with lower serum levels of oxytocin (87,88). The valerenal present in the EEVO has some structural similarity with the valepotriates (presence of 5 and 6-membered rings), and it is possible that valerenal plays a role in the sedative effect of Valerian essential oil (89). Thus, the sedative action of valerian could be responsible for preventing this adrenergic stimulation and preventing the inhibition of oxytocin secretion (80), being partially responsible for the results found in this study. Thus, other studies on the effects of sedative and anxiolytic activity of medicinal plants, such as Valerian, on the production of breast milk should be carried out to elucidate the possible mechanisms of action.

## **Conclusion**

The ethanolic extract of the root of *Valeriana officinalis* and the dichloromethane fraction have galactagogue activity, promoting an increase in litter weight due to increased concentrations of proteins and triglycerides in the milk, and for maintaining a more active and secretory mammary gland at the end of the experiment. These effects were probably induced due to an increase in serum prolactin concentrations and in the mammary gland promoted by the presence of phytoestrogens in the ethanolic extract. In this way, the Valerian root has galactagogue activity and is an important natural source for the identification of new bioactive molecules, and further studies should be carried out to evaluate the mechanisms of action, as well as the safety of its medicinal use in lactation.

## References

1. UNICEF. Breastfeeding: A mother's gift, for every child. 2018; Available from: <https://data.unicef.org/resources/breastfeeding-a-mothers-gift-for-every-child/>
2. Victora CG, Bahl R, Barros AJD, França GVA, Horton S, Krasevec J, et al. Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* [Internet]. 2016;387(10017):475–90. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7)
3. Del Ciampo LA, Del Ciampo IRL. Breastfeeding and the Benefits of Lactation for Women's Health Aleitamento materno e seus benefícios para a saúde da mulher. *Rev Bras Ginecol Obs* [Internet]. 2018;40:354–9. Available from: <https://doi.org/>
4. Bazzano AN, Cenac L, Brandt AJ, Barnett J, Thibeau S, Theall KP. Maternal experiences with and sources of information on galactagogues to support lactation: A Cross-Sectional study. *Int J Womens Health*. 2017;9:105–13.
5. Brodribb W. ABM Clinical Protocol #9: Use of Galactagogues in Initiating or Augmenting Maternal Milk Production, Second Revision 2018. *Breastfeed Med*. 2018;13(5):307–14.
6. Wagner CL, Boan AD, Marzolf A, Finch CW, Morella K, Guille C, et al. The Safety of Mother's Milk® Tea: Results of a Randomized Double-Blind, Controlled Study in Fully Breastfeeding Mothers and Their Infants. *J Hum Lact*. 2019;35(2):248–60.
7. Mohanty L, Amarpal KP, Hp A, Am P, Kumar A, Singh J, et al. Ethnoveterinary importance of herbal galactagogues - a review. *Vet World* [Internet]. 2014;7(8):566–73. Available from: [www.veterinaryworld.org/Vol.7/August-2014/4.pdf](http://www.veterinaryworld.org/Vol.7/August-2014/4.pdf)
8. Tabares FP, Jaramillo JVB, Ruiz-cortés ZT. Pharmacological Overview of Galactagogues. 2014;2014.
9. Fernández S, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;77(2):399–404.
10. Seidler-Lozykowska K, Mielcarek S, Baraniak M. Content of essential oil and valerenic acids in valerian (*valeriana officinalis* L.) roots at the selected developmental phases. *J Essent Oil Res*. 2009;21(5):413–6.
11. Allaire AD, Moos MK, Wells SR. Complementary and alternative medicine in pregnancy: A survey of North Carolina certified nurse-midwives. *Obstet Gynecol*. 2000;95(1):19–23.
12. Jacobson H. *Mother Food: food and herbs tha promote milk production and mother's health*. 3rd ed. Books MFS, editor. Mother Food Series; 2004. 32 p.
13. Christian LM, Carroll JE, Teti DM, Hall MH. Maternal Sleep in Pregnancy and Postpartum Part I: Mental, Physical, and Interpersonal Consequences. *Curr Psychiatry Rep*. 2019;21(3).
14. Cox EQ, Stuebe A, Pearson B, Grewen K, Rubinow D, Meltzer-Brody S. Oxytocin and HPA stress axis reactivity in postpartum women. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 2015;55:164–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.02.009>
15. Winter J, Jurek B. The interplay between oxytocin and the CRF system: regulation of the stress response. *Cell Tissue Res*. 2019;375(1):85–91.
16. Falkenberg M de B, Santos SI, Simões CMO. Introdução à Análise Fitoquímica. In: Simões CMO, Shenkel EP, Gosmann G, editors. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5th ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC; 2006. p. 230–88.
17. Costa AF. *Farmacognosia: Farmacognosia Experimental*. 3rd ed. Gullbenkian FC, editor. Fundação Calouste Gulbenkian; 2001. 992 p.
18. Wagner H, Blad S, Rickl V. *Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer Science & Business Media; 2001. 385 p.
19. Brossi A. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. 3rd ed. Academic Press; 1988. 454 p.
20. Cruz MP, Andrade CMF, Silva KO, De Souza EP, Yatsuda R, Marques LM, et al.

- Antinoceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and flavones isolated from *mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). *PLoS One*. 2016;11(3):1–29.
21. Grigor MR, Poczwa Z, Arthur PG. Milk lipid synthesis and secretion during milk stasis in the rat. *J Nutr* [Internet]. 1986;116(9):1789–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3761033><http://jn.nutrition.org/content/116/9/1789.full.pdf>
  22. Troina AA, Figueiredo MS, Passos MCF, Reis AM, Oliveira E, Lisboa PC, et al. Flaxseed bioactive compounds change milk, hormonal and biochemical parameters of dams and offspring during lactation. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2012;50(7):2388–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.040>
  23. Oliveira E, Pinheiro CR, Santos-Silva AP, Trevenzolil, Abreu-Villaça Y, Nogueira Neto JF, et al. Nicotine exposure affects mother's and pup's nutritional, biochemical, and hormonal profiles during lactation in rats. *J Endocrinol*. 2010;205(2):159–70.
  24. Penha-Silva N, Fonseca, Alessandra M, Brito, Ana G, Souza-Penha, Márcia A, Ferreira, Tales, Alexandre A. Rapid Determination of Reducing Sugars With Picric Acid for. *Biosci J*. 2004;20:183–8.
  25. Costa TH, Dorea JG, T.H.M. C. Concentration of fat, protein, lactose and energy in milk of mothers using hormonal contraceptives. *Ann Trop Paediatr* [Internet]. 1992;12(2):203–9. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed2&NEWS=N&AN=1992192875>
  26. Akers RM. A 100-Year Review: Mammary development and lactation. *J Dairy Sci* [Internet]. 2017;100(12):10332–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-12983>
  27. Falzon CC, Balabanova A. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. *Prim Care - Clin Off Pract*. 2017;44(2):217–27.
  28. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Dietary supplement fact sheet: valerian. *Office Diet Suppl*. 2008;
  29. Gupta M, Shaw B. A double-blind randomized clinical trial for evaluation of galactagogue activity of *asparagus racemosus willd*. *Iran J Pharm Res*. 2011;10(1):167–72.
  30. Buntuchai G, Pavadhgul P, Kittipichai W, Satheannoppakao W. Traditional Galactagogue Foods and Their Connection to Human Milk Volume in Thai Breastfeeding Mothers. *J Hum Lact*. 2017;33(3):552–9.
  31. Zecca E, Zuppa AA, D'Antuono A, Tiberi E, Giordano L, Pianini T, et al. Efficacy of a galactagogue containing silymarin-phosphatidylserine and galega in mothers of preterm infants: A randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2016;70(10):1151–4.
  32. Upadhyay S, Jeena GS, Shikha, Shukla RK. Recent advances in steroidal saponins biosynthesis and in vitro production. *Planta* [Internet]. 2018;248(3):519–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2911-0>
  33. Di Gioia F, Petropoulos SA. Phytoestrogens, phytosteroids and saponins in vegetables: Biosynthesis, functions, health effects and practical applications [Internet]. 1st ed. Vol. 90, *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Inc.; 2019. 351–421 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.004>
  34. Tabares FP, Jaramillo JVB, Ruiz-Cortés ZT. Pharmacological Overview of Galactagogues. *Vet Med Int*. 2014;2014.
  35. Lind MV, Larnkjær A, Mølgaard C, Michaelsen KF. Breastfeeding, breast milk composition, and growth outcomes. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. 2018;89:63–77.
  36. Sevrin T, Alexandre-Gouabau MC, Darmaun D, Palvadeau A, André A, Nguyen P, et al. Use of water turnover method to measure mother's milk flow in a rat model: Application to dams receiving a low protein diet during gestation and lactation. *PLoS One*. 2017;12(7):1–13.

37. Hosseinzadeh H, Tafaghodi M, Abedzadeh S, Taghiabadi E. Effect of aqueous and ethanolic extracts of *Pimpinella anisum* L. seeds on milk production in rats. *JAMS J Acupunct Meridian Stud* [Internet]. 2014;7(4):211–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jams.2013.10.004>
38. Morag M, Popliker F, Yagil R. Effect of litter size on milk yield in the rat. *Lab Anim*. 1975;9(1):43–7.
39. Williamson DH. Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Lett*. 1980;117(August):K93–105.
40. Oftedal OT. Animal Nutrition and Metabolism Group Symposium on “Regulation of maternal reserves and effects on lactation and the nutrition of young animals” Use of maternal reserves as a lactation strategy in large mammals. *Proc Nutr Soc*. 2000;59:99–106.
41. Hawkins RA. Measurements of Substrate Uptake by Mammary Gland of the Rat. *Biochem J*. 1972;129:1171–3.
42. Grota LJ, Ader R. Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus norvegicus*. *Anim Behav*. 1969;17(4):722–9.
43. Paul HA, Hallam MC, Reimer RA. Milk collection in the rat using capillary tubes and estimation of milk fat content by creatocrit. *J Vis Exp*. 2015;2015(106):1–6.
44. Bautista CJ, Bautista RJ, Montañó S, Reyes-Castro LA, Rodríguez-Peña ON, Ibáñez CA, et al. Effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on milk composition and offspring development. *Br J Nutr*. 2019;122(2):141–51.
45. Pomar CA, Kuda O, Kopecky J, Rombaldova M, Castro H, Picó C, et al. Maternal diet, rather than obesity itself, has a main influence on milk triacylglycerol profile in dietary obese rats. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2020;1865(2):158556. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158556>
46. Sevrin T, Alexandre-Gouabau MC, Castellano B, Aguesse A, Ouguerram K, Ngyuen P, et al. Impact of fenugreek on milk production in rodent models of lactation challenge. *Nutrients*. 2019;11(11):1–21.
47. Noro G. Síntese e secreção do leite. Semin apresentado na Discip Bioquímica do Tecido Anim. 2001;(Vet 00036):1–21.
48. Schwertfeger KL, McManaman JL, Palmer CA, Neville MC, Anderson SM. Expression of constitutively activated Akt in the mammary gland leads to excess lipid synthesis during pregnancy and lactation. *J Lipid Res*. 2003;44(6):1100–12.
49. Keller SR, Abonyi-Tóth Z, Sprenger N, Austin SC, Wichert BAC, Liesegang A, et al. Effect of metoclopramide treatment of bitches during the first week of lactation on serum prolactin concentration, milk composition, and milk yield and on weight gain of their puppies. *Am J Vet Res*. 2018;79(2):233–41.
50. Powe CE, Puopolo KM, Newburg DS, Lönnerdal B, Chen C, Allen M, et al. Effects of recombinant human prolactin on breast milk composition. *Pediatrics*. 2011;127(2).
51. Campbell-Yeo ML, Allen AC, Joseph KS, Ledwidge JM, Caddell K, Allen VM, et al. Effect of domperidone on the composition of preterm human breast milk. *Pediatrics*. 2010;125(1).
52. Abdel-Rahman H, Fathalla SI, Ezzat Assayed M, Ramadan Masoad S, Abdelaleem Nafeaa A. Physiological Studies on the Effect of Fenugreek on Productive Performance of White New-Zealand Rabbit Does. *Food Nutr Sci*. 2016;07(13):1276–89.
53. Brisken C, Rajaram RD. Alveolar and lactogenic differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2006;11(3–4):239–48.
54. Kass L, Altamirano GA, Bosquiazzo VL, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. Perinatal exposure to xenoestrogens impairs mammary gland differentiation and modifies milk composition in Wistar rats. *Reprod Toxicol*. 2012;33(3):390–400.
55. Rudolph MC, McManaman JL, Phang T, Russell T, Kominsky DJ, Serkova NJ, et al. Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. *Physiol Genomics*.

- 2007;28(3):323–36.
56. Wall E, McFadde T. Regulation of Mammary Development as It Relates to Changes in Milk Production Efficiency. *Milk Prod - An Up-to-Date Overv Anim Nutr Manag Heal*. 2012;
  57. Mortel M, Mehta SD. Systematic review of the efficacy of herbal galactogogues. *J Hum Lact [Internet]*. 2013;29(2):154–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23468043>
  58. Capuco A V, Ellis SE, Hale SA, Long E, Erdman RA, Zhao X, et al. Lactation persistency : Insights from mammary cell proliferation studies. *J Anim Sci*. 2003;18–31.
  59. Boutinaud M, Guinard-flament J, Jammes H. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *Reprod Nutr Dev*. 2005;44(1):89–98.
  60. Macias H, Hinck L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2012;1(4):533–57.
  61. Clapp C, Thebault S, de la Escalera GM. Role of prolactin and vasoinhibins in the regulation of vascular function in mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008;13(1):55–67.
  62. Clapp C, Thebault S, Macotela Y, Moreno-Carranza B, Triebel J, La Escarela G. RegCLAPP, C. et al. Regulation of Blood Vessels by Prolactin and Vasoinhibins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 846, p. 97–137, 2018. ulation of Blood Vessels by Prolactin and Vasoinhibins. *Adv Exp Med Biol*. 2018;846:97–137.
  63. Crowley WR. Neuroendocrine regulation of lactation and milk production. *Compr Physiol*. 2015;5(1):255–91.
  64. Özalkaya E, Aslandoğdu Z, Özkoral A, Topcuoğlu S, Karatekin G. Effect of a galactagogue herbal tea on breast milk production and prolactin secretion by mothers of preterm babies. *Niger J Clin Pract*. 2018;21(1):38–42.
  65. Paritakul P, Ruangrongmorakot K, Laosooksathit W, Suksamarnwong M, Puapornpong P. The effect of ginger on breast milk volume in the early postpartum period: A randomized, double-blind controlled trial. *Breastfeed Med*. 2016;11(7):361–5.
  66. Tong JJ, Thompson IM, Zhao X, Lacasse P. Effect of the concentration of circulating prolactin on dairy cows' responsiveness to domperidone injection. *J Dairy Sci [Internet]*. 2018;101(3):2579–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13828>
  67. Groner B, Gouilleux F. Prolactin-mediated gene activation in mammary epithelial cells. *Curr Opin Genet Dev*. 1995;5(5):587–94.
  68. Groner B. Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. *Domest Anim Endocrinol*. 2002;23(1–2):25–32.
  69. Augustine RA, Ladyman SR, Bouwer GT, Alyousif Y, Sapsford TJ, Scott V, et al. Prolactin regulation of oxytocin neurone activity in pregnancy and lactation. *J Physiol*. 2017;595(11):3591–605.
  70. Kobayashi K, Oyama S, Kuki C, Tsugami Y, Matsunaga K, Suzuki T, et al. Distinct roles of prolactin, epidermal growth factor, and glucocorticoids in  $\beta$ -casein secretion pathway in lactating mammary epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol [Internet]*. 2017;440:16–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.006>
  71. Rudolph MC, Russell TD, Webb P, Neville MC, Anderson SM. Prolactin-mediated regulation of lipid biosynthesis genes in vivo in the lactating mammary epithelial cell. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2011;300(6):1059–68.
  72. Tabanca N, Khan SI, Bedir E, Annavarapu S, Willett K, Khan IA, et al. Estrogenic activity of isolated compounds and essential oils of *Pimpinella* species from Turkey, evaluated using a recombinant yeast screen. *Planta Med*. 2004;70(8):728–35.
  73. Albert-Puleo M. Fennel and anise as estrogenic agents. *J Ethnopharmacol [Internet]*. 1980;2(4):337–44. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(80\)81015-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(80)81015-4)
  74. Franks S. Prolactin Secretion. *Endocr Disord*. 1984;108(2):651–5.

75. Gérard C, Blacher S, Communal L, Courtin A, Tskitishvili E, Mestdagt M, et al. Estetrol is a weak estrogen antagonizing estradiol-dependent mammary gland proliferation. *J Endocrinol*. 2014;224(1):85–95.
76. Jenabi E, Shobeiri F, Hazavehei SMM, Roshanaei G. The effect of Valerian on the severity and frequency of hot flashes: A triple-blind randomized clinical trial. *Women Heal*. 2018;58(3):297–304.
77. Mirabi P, Mojab F. The effects of valerian root on hot flashes in menopausal women. *Iran J Pharm Res*. 2013;12(1):217–22.
78. Dietz BM, Mahady GB, Pauli GF, Farnsworth NR. Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT<sub>5a</sub> receptor in vitro. *Mol Brain Res*. 2005;138(2):191–7.
79. Bruckmaier RM, Wellnitz O. Induction of milk ejection and milk removal in different production systems. *J Anim Sci*. 2008;86(13 Suppl):15–20.
80. Nostrand SD, Galton DM, Erb HN, Bauman DE. Effects of Daily Exogenous Oxytocin on Lactation Milk Yield and Composition. *J Dairy Sci* [Internet]. 1991;74(7):2119–27. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78384-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78384-7)
81. Forinash AB, Yancey AM, Barnes KN, Myles TD. The Use of Galactogogues in the Breastfeeding Mother. 2012;46.
82. Lollivier V, Marnet PG, Delpal S, Rainteau D, Achard C, Rabot A, et al. Oxytocin stimulates secretory processes in lactating rabbit mammary epithelial cells. *J Physiol*. 2006;570(1):125–40.
83. Ballou LU, Bleck JL, Bleck GT, Bremel RD. The Effects of Daily Oxytocin Injections Before and After Milking on Milk Production, Milk Plasmin, and Milk Composition. *J Dairy Sci* [Internet]. 1993;76(6):1544–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77487-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77487-1)
84. Zamiri MJ, Qotbi A, Izadifard J. Effect of daily oxytocin injection on milk yield and lactation length in sheep. *Small Rumin Res*. 2001;40(2):179–85.
85. MacLean EL, Wilson SR, Martin WL, Davis JM, Nazarloo HP, Carter CS. Challenges for measuring oxytocin: The blind men and the elephant? *Psychoneuroendocrinology*. 2019;107(March):225–31.
86. Cox EQ, Stuebe A, Pearson B, Grewen K, Rubinow D, Meltzer-Brody S. Oxytocin and HPA stress axis reactivity in postpartum women. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 2015;55:164–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.02.009>
87. Lara-Cinisomo S, McKenney K, Di Florio A, Meltzer-Brody S. Associations between Postpartum Depression, Breastfeeding, and Oxytocin Levels in Latina Mothers. *Breastfeed Med*. 2017;12(7):436–42.
88. Garfield L, Holditch-Davis D, Carter CS, McFarlin BL, Seng JS, Giurgescu C, et al. A Pilot Study of Oxytocin in Low-Income Women with a Low Birth-Weight Infant: Is Oxytocin Related to Posttraumatic Stress? *Adv Neonatal Care*. 2019;19(4):E12–21.
89. Wheatley D. Medicinal plants for insomnia: A review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *J Psychopharmacol*. 2005;19(4):414–21.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato etanólico da raiz de *Valeriana officinalis* e a fração diclorometano possuem atividade galactogoga, promovendo o aumento de peso da ninhada devido ao aumento das concentrações de proteínas e triglicerídeos do leite, e por manter uma glândula mamária mais ativa e secretora no final do experimento. Esses efeitos provavelmente foram induzidos devido à um aumento das concentrações de prolactina no soro e na glândula mamária promovidas pela presença de fitoestrógenos no extrato etanólico. Deste modo, a raiz de *Valeriana* possui atividade galactogoga e é uma importante fonte natural para a identificação de novas moléculas bioativas, e mais estudos devem ser realizados para avaliar os mecanismos de ação, assim como a segurança do seu uso medicinal na lactação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, H. et al. Physiological Studies on the Effect of Fenugreek on Productive Performance of White New-Zealand Rabbit Does. **Food and Nutrition Sciences**, v. 07, n. 13, p. 1276–1289, 2016.
- ACCORSI, P. A. et al. Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 507–513, 2002.
- AKERS, R. M. A 100-Year Review: Mammary development and lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10332–10352, 2017.
- ALLAIRE, A. D.; MOOS, M. K.; WELLS, S. R. Complementary and alternative medicine in pregnancy: A survey of North Carolina certified nurse-midwives. **Obstetrics and Gynecology**, v. 95, n. 1, p. 19–23, 2000.
- ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**, v. 91, n. 11, p. 629–635, 2015.
- ANDRES, A. C.; DJONOV, V. The mammary gland vasculature revisited. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 3, p. 319–328, 2010.
- ARENDDT, L. M.; KUPERWASSER, C. Form and Function: how Estrogen and Progesterone Regulate the Mammary Epithelial Hierarchy. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 20, n. 1–2, p. 9–25, 2015.
- ARGOV-ARGAMAN, N. et al. Human milk fatty acids composition is affected by maternal age. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 30, n. 1, p. 34–37, 2017.
- ASZTALOS, E. V. Supporting mothers of very preterm infants and breast milk production: A review of the role of galactogogues. **Nutrients**, v. 10, n. 5, 2018.
- BALLOU, L. U. et al. The Effects of Daily Oxytocin Injections Before and After Milking on Milk Production, Milk Plasmin, and Milk Composition. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 6, p. 1544–1549, 1993.
- BAUTISTA, C. J. et al. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. **British Journal of Nutrition**, v. 115, n. 3, p. 538–546, 2016.
- BAUTISTA, C. J. et al. Effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on milk composition and offspring development. **British Journal of Nutrition**, v. 122, n. 2, p. 141–151, 2019.
- BAZZANO, A. N. et al. Maternal experiences with and sources of information on galactogogues to support lactation: A Cross-Sectional study. **International Journal of Women's Health**, v. 9, p. 105–113, 2017.



BEN-JONATHAN, N. et al. Extrapituitary prolactin: Distribution, regulation, functions, and clinical aspects. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 6, p. 639–669, 1996.

BENT, S. et al. Valerian for Sleep: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Medicine**, v. 119, n. 12, p. 1005–1012, 2006.

BERING, S. B. Human milk oligosaccharides to prevent gut dysfunction and necrotizing enterocolitis in preterm neonates. **Nutrients**, v. 10, n. 10, 2018.

BINNS, C.; LEE, M.; LOW, W. Y. The Long-Term Public Health Benefits of Breastfeeding. **Asia-Pacific Journal of Public Health**, v. 28, n. 1, p. 7–14, 2016.

BOUTINAUD, M.; GUINARD-FLAMENT, J.; JAMMES, H. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. **Reproduction, nutrition, development**, v. 44, n. 1, p. 89–98, 2005.

BRANDORFF, N. P. The effect of dietary fat on the fatty acid composition of lipids secreted in rats' milk. **Lipids**, v. 15, n. 4, p. 276–278, 1980.

BRENMOEHL, J. et al. Cytokines in milk and the role of TGF-beta. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 47–56, 2018.

BRODRIBB, W. ABM Clinical Protocol #9: Use of Galactogogues in Initiating or Augmenting Maternal Milk Production, Second Revision 2018. **Breastfeeding Medicine**, v. 13, n. 5, p. 307–314, 2018.

BROSSI, A. **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. 3. ed. [s.l.] Academic Press, 1988.

BRUCKMAIER, R. M.; WELLNITZ, O. Induction of milk ejection and milk removal in different production systems. **Journal of animal science**, v. 86, n. 13 Suppl, p. 15–20, 2008.

BRUNTON, L. L. et al. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. [s.l.: s.n.].

BUNTUCHAI, G. et al. Traditional Galactagogue Foods and Their Connection to Human Milk Volume in Thai Breastfeeding Mothers. **Journal of Human Lactation**, v. 33, n. 3, p. 552–559, 2017.

BURBACH, H.; YOUNG, L, J. Oxytocin : Synthesis , Secretion and Reproductive Functions . Knobil and Neill , Physiology of Reproduction . **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, n. August, p. 3055–3128, 2017.

CACHO, N. T.; LAWRENCE, R. M. Innate immunity and breast milk. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, 2017.

CAMPBELL-YEO, M. L. et al. Effect of domperidone on the composition of preterm

human breast milk. **Pediatrics**, v. 125, n. 1, 2010.

CAPUCO, A. V et al. Lactation persistency : Insights from mammary cell proliferation studies. **J. Anim. Sci.**, p. 18–31, 2003.

CARVALHO, D. P. **Exposição materna à Valeriana durante a lactação altera o comportamento materno e o desenvolvimento pós-natal das crias?** [s.l.] Universidade Federal de Juíz de Fora, 2018.

CHAVES, R. G.; LAMOUNIER, J. A.; CÉSAR, C. C. Medicamentos e amamentação: atualização e revisão aplicadas à clínica materno-infantil. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 25, n. 3, p. 276–288, 2007.

CHOWDHURY, R. et al. Breastfeeding and maternal health outcomes: A systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 104, p. 96–113, 2015.

CHRISTIAN, L. M. et al. Maternal Sleep in Pregnancy and Postpartum Part I: Mental, Physical, and Interpersonal Consequences. **Current Psychiatry Reports**, v. 21, n. 3, 2019.

CLAPP, C. et al. Regulation of Blood Vessels by Prolactin and Vasoinhibins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 846, p. 97–137, 2018.

COHICK, W. S.; BRUNSWICK, N. Effects of insulin on mammary gland differentiation during pregnancy and lactation 1. **J Anim Sci**, p. 1–23, 2016.

COSTA, A. F. **Farmacognosia: Farmacognosia Experimental**. 3. ed. [s.l.] Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

COSTA, T. H.; DOREA, J. G.; T.H.M., C. Concentration of fat, protein, lactose and energy in milk of mothers using hormonal contraceptives. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 12, n. 2, p. 203–209, 1992.

COSTA, T. H. M. D. A.; WILLIAMSON, D. H. Regulation of rat mammary-gland uptake of orally administered [ 1-14C ] triolein by insulin and prolactin : evidence for bihormonal control of lipoprotein lipase activity. v. 262, n. 1 994, p. 257–262, 1994.

COX, E. Q. et al. Oxytocin and HPA stress axis reactivity in postpartum women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 55, p. 164–172, 2015a.

COX, E. Q. et al. Oxytocin and HPA stress axis reactivity in postpartum women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 55, p. 164–172, 2015b.

CROWLEY, W. R. Neuroendocrine regulation of lactation and milk production. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 1, p. 255–291, 2015.

CRUZ, M. P. et al. Antinoceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract,

fractions and flavones isolated from mimosa tenuiflora (Willd.) Poir (Leguminosae). **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–29, 2016.

DEL CIAMPO, L. A.; DEL CIAMPO, I. R. L. Breastfeeding and the Benefits of Lactation for Women's Health Aleitamento materno e seus benefícios para a saúde da mulher. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 40, p. 354–359, 2018.

DI GIOIA, F.; PETROPOULOS, S. A. **Phytoestrogens, phytosteroids and saponins in vegetables: Biosynthesis, functions, health effects and practical applications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 90

ERIKSEN, K. G. et al. Human milk composition and infant growth. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 21, n. 3, p. 200–206, 2018.

FALKENBERG, M. DE B.; SANTOS, S. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. (Eds.). . **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2006. p. 230–288.

FALZON, C. C.; BALABANOVA, A. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 2, p. 217–227, 2017.

FERNÁNDEZ, S. et al. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 2, p. 399–404, 2004.

FORINASH, A. B. et al. The Use of Galactogogues in the Breastfeeding Mother. v. 46, 2012.

FREEMAN, M, A.; KANYICKSKA, B.; LERANT, A. Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, v. 80, n. 4, p. 1703–1726, 2006.

GARFIELD, L. et al. A Pilot Study of Oxytocin in Low-Income Women with a Low Birth-Weight Infant: Is Oxytocin Related to Posttraumatic Stress? **Advances in Neonatal Care**, v. 19, n. 4, p. E12–E21, 2019.

GAROFALO, R. Cytokines in Human Milk. **Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 2 SUPPL., p. S36–S40, 2010.

GARWOLIŃSKA, D. et al. Chemistry of Human Breast Milk - A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 45, p. 11881–11896, 2018.

GIDREWICZ, D. A.; FENTON, T. R. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. **BMC Pediatrics**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2014.

GONZÁLEZ, F. H. D. Faculdade de Veterinária Introdução a Endocrinologia Reprodutiva

Veterinária. 2002.

GOUON-EVANS, V.; LIN, E. Y.; POLLARD, J. W. Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. **Breast Cancer Research**, v. 4, n. 4, p. 155–164, 2002.

GRATTAN, D. R. The hypothalamo-prolactin axis. **Journal of Endocrinology**, v. 226, n. 2, p. T101–T122, 2018.

GRATTAN, D. R.; KOKAY, I. C. Prolactin: A pleiotropic neuroendocrine hormone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 752–763, 2008.

GRIGOR, M. R.; POCZWA, Z.; ARTHUR, P. G. Milk lipid synthesis and secretion during milk stasis in the rat. **J Nutr**, v. 116, n. 9, p. 1789–1797, 1986a.

GRIGOR, M. R.; POCZWA, Z.; ARTHUR, P. G. Milk lipid synthesis and secretion during milk stasis in the rat. **J Nutr**, v. 116, n. 9, p. 1789–1797, 1986b.

GRONER, B. Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1–2, p. 25–32, 2002.

GRONER, B.; GOUILLEUX, F. Prolactin-mediated gene activation in mammary epithelial cells. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 5, n. 5, p. 587–594, 1995.

GROTA, L. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus norvegicus*. **Animal Behaviour**, v. 17, n. 4, p. 722–729, 1969.

GRZESKOWIAK, L. E.; WLODEK, M. E.; GEDDES, D. T. What evidence do we have for pharmaceutical galactagogues in the treatment of lactation insufficiency?—a narrative review. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1–21, 2019.

GUPTA, M.; SHAW, B. A double-blind randomized clinical trial for evaluation of galactagogue activity of *asparagus racemosus* willd. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 1, p. 167–172, 2011.

HADLEY, S.; PETRY, J. J. Valerian. **American Family Physician**, v. 67, n. 8, p. 1755–1758, 2003.

HASCHKE, F.; HAIDEN, N.; THAKKAR, S. K. Nutritive and bioactive proteins in breastmilk. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 69, n. 2, p. 17–26, 2017.

HAWKINS, R. A. Measurements of Substrate Uptake by Mammary Gland of the Rat. **Biochem. J.**, v. 129, p. 1171–1173, 1972.

HENNET, T.; BORSIG, L. Breastfed at Tiffany 's. **Trends in Biochemical Sciences**, v. xx, p. 1–11, 2016.

HO, N. T. et al. Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut

microbiota across populations. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

HOSSEINZADEH, H. et al. Effect of aqueous and ethanolic extracts of *Pimpinella anisum* L. seeds on milk production in rats. **JAMS Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 7, n. 4, p. 211–216, 2014.

HUANG, H. S.; KUAN, J. C. W.; GUILBAULT, G. G. Fluorometric enzymatic determination of total cholesterol in serum. **Clinical Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 1605–1608, 1975.

HURLEY, W. L.; THEIL, P. K. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. **Nutrients**, v. 3, n. 4, p. 442–474, 2011.

INMAN, J. L. et al. Mammary gland development: Cell fate specification, stem cells and the microenvironment. **Development (Cambridge)**, v. 142, n. 6, p. 1028–1042, 2015.

JACOBSON, H. **Mother Food: food and herbs tha promote milk production and mother's health**. 3. ed. [s.l.] Mother Food Series, 2004.

JAVAN, R.; JAVADI, B.; FEYZABADI, Z. Breastfeeding: A review of its physiology and galactogogue plants in view of traditional Persian medicine. **Breastfeeding Medicine**, v. 12, n. 7, 2017.

JENA, M. K. et al. Molecular mechanism of mammary gland involution: An update. **Developmental Biology**, v. 445, n. 2, p. 145–155, 2019.

KEEN, C. L. et al. Developmental Changes in Composition of Rat Milk: Trace Elements, Minerals, Protein, Carbohydrate and Fat. **The Journal of Nutrition**, v. 111, n. 2, p. 226–236, 1981a.

KEEN, C. L. et al. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. **The Journal of nutrition**, v. 111, n. 2, p. 226–236, 1981b.

KEIKHA, M. et al. Macro- and Micronutrients of Human Milk Composition: Are They Related to Maternal Diet? A Comprehensive Systematic Review. **Breastfeeding Medicine**, v. 12, n. 9, p. 517–527, 2017.

KELLER, S. R. et al. Effect of metoclopramide treatment of bitches during the first week of lactation on serum prolactin concentration, milk composition, and milk yield and on weight gain of their pups. **American Journal of Veterinary Research**, v. 79, n. 2, p. 233–241, 2018.

KHAN, T. M.; WU, D. B. C.; DOLZHENKO, A. V. Effectiveness of fenugreek as a galactagogue: A network meta-analysis. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 3, p. 402–412, 2018.

KOBAYASHI, K. et al. Distinct roles of prolactin, epidermal growth factor, and glucocorticoids in  $\beta$ -casein secretion pathway in lactating mammary epithelial cells.

**Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 440, p. 16–24, 2017.

KOLETZKO, B. et al. Physiological aspects of human milk lipids. **Early Human Development**, v. 65, n. SUPPL. 2, p. 3–18, 2001.

KROL, K. M.; GROSSMANN, T. Psychological effects of breastfeeding on children and mothers. **Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz**, v. 61, n. 8, p. 977–985, 2018.

LACTMED, D. AND L. D. **Valerian**.

LARA-CINISOMO, S. et al. Associations between Postpartum Depression, Breastfeeding, and Oxytocin Levels in Latina Mothers. **Breastfeeding Medicine**, v. 12, n. 7, p. 436–442, 2017.

LIAO, Y. et al. Proteomic characterization of human milk fat globule membrane proteins during a 12 month lactation period. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 8, p. 3530–3541, 2011.

LIND, M. V. et al. Breastfeeding, breast milk composition, and growth outcomes. **Nestle Nutrition Institute Workshop Series**, v. 89, p. 63–77, 2018.

LOLLIVIER, V. et al. Oxytocin stimulates secretory processes in lactating rabbit mammary epithelial cells. **Journal of Physiology**, v. 570, n. 1, p. 125–140, 2006.

LOMPO-OUEDRAOGO, Z.; HEIDE, D. VAN DER. Effect of aqueous extract of *Acacia nilotica* ssp *adansonii* on milk production and prolactin release in the rat. p. 257–266, 2004.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 6, 2003.

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary gland development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 4, p. 533–557, 2012.

MACLEAN, E. L. et al. Challenges for measuring oxytocin: The blind men and the elephant? **Psychoneuroendocrinology**, v. 107, n. March, p. 225–231, 2019.

MADISCH, A. et al. Modulation of gastrointestinal motility beyond metoclopramide and domperidone: Pharmacological and clinical evidence for phytotherapy in functional gastrointestinal disorders. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 167, n. 7–8, p. 160–168, 2017.

MASSO-WELCH, P, A.; DARCY, K, M.; TANGLE-CASTOR, N, C. A Developmental Atlas of Rat Mammary Gland Histology. **Mammary Gle Biol Neoplasia**, v. 5, p. 165–185, 2000.

MELLO, J. R. B. et al. Toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Gossypium herbaceum* (algodoeiro) em ratos Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 46–55, 2008.

MENCHETTI, L. et al. Potential benefits of colostrum in gastrointestinal diseases. p. 331–351, 2016.

MESSIAS, G. C. et al. Administration of *Lactobacillus plantarum* Lp62 to dam rats at the end of delivery and during lactation affects TGF- $\beta$ 1 level and nutritional milk composition, and body weight of pups. **European Journal of Nutrition**, v. 58, n. 3, p. 1137–1146, 2019.

MOHANTY, L. et al. Ethnoveterinary importance of herbal galactagogues - a review. **Veterinary World**, v. 7, n. 8, p. 566–573, 2014.

MORAG, M.; POPLIKER, F.; YAGIL, R. Effect of litter size on milk yield in the rat. **Laboratory Animals**, v. 9, n. 1, p. 43–47, 1975.

MUNOZ, F. M.; JAMIESON, D. J. Maternal Immunization. **Obstetrics and gynecology**, v. 133, n. 4, p. 739–753, 2019.

NAPSO, T. et al. *iv o r l a n o l*. 2018.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Dietary supplement fact sheet: valerian. **Office of Dietary Supplements**, 2008.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (US). **Drugs and Lactation Database (LactMed)**.

NGUYEN, A. V.; POLLARD, J. W. Transforming growth factor  $\beta$ 3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution. **Development**, v. 127, n. 14, p. 3107–3118, 2000.

NICHOLAS, K. R.; HARTMANN, P. E. Milk secretion in the rat: Progressive changes in milk composition during lactation and weaning and the effect of diet. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 98, n. 3–4, p. 535–542, 1991.

NOMMSEN-RIVERS, L. A. Does Insulin Explain the Relation between Maternal Obesity and Poor Lactation Outcomes? An Overview of the Literature. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 2, p. 407–414, 2016.

NOSTRAND, S. D. et al. Effects of Daily Exogenous Oxytocin on Lactation Milk Yield and Composition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 7, p. 2119–2127, 1991a.

NOSTRAND, S. D. et al. Effects of Daily Exogenous Oxytocin on Lactation Milk Yield and Composition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 7, p. 2119–2127, 1991b.

ODDY, W. H. Breastfeeding, Childhood Asthma, and Allergic Disease. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 70, n. 2, p. 26–36, 2017.

OFTEDAL, O. T. Animal Nutrition and Metabolism Group Symposium on “Regulation of maternal reserves and effects on lactation and the nutrition of young animals” Use of

maternal reserves as a lactation strategy in large mammals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, p. 99–106, 2000.

OLIVEIRA, E. et al. Nicotine exposure affects mother's and pup's nutritional, biochemical, and hormonal profiles during lactation in rats. **Journal of Endocrinology**, v. 205, n. 2, p. 159–170, 2010.

ORTIZ, J. G.; NIEVES-NATAL, J.; CHAVEZ, P. Effects of Valeriana Officinalis extracts on [3H]flunitrazepam binding, synaptosomal [3H]GABA uptake, and hippocampal [3H]GABA release. **Neurochemical Research**, v. 24, n. 11, p. 1373–1378, 1999.

OSADCHY, A.; MORETTI, M. E.; KOREN, G. Effect of Domperidone on Insufficient Lactation in Puerperal Women: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Obstetrics and Gynecology International**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

ÖZALKAYA, E. et al. Effect of a galactagogue herbal tea on breast milk production and prolactin secretion by mothers of preterm babies. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 21, n. 1, p. 38–42, 2018.

PARITAKUL, P. et al. The effect of ginger on breast milk volume in the early postpartum period: A randomized, double-blind controlled trial. **Breastfeeding Medicine**, v. 11, n. 7, p. 361–365, 2016.

PAUL, C. et al. Use of domperidone as a galactagogue drug: A systematic review of the benefit-risk ratio. **Journal of Human Lactation**, v. 31, n. 1, p. 57–63, 2015.

PENHA-SILVA, N. et al. Rapid Determination of Reducing Sugars With Picric Acid for. **Bioscience Journal**, v. 20, p. 183–188, 2004.

PERUCCA, E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: A summary after 35 years of clinical experience. **CNS Drugs**, v. 16, n. 10, p. 695–714, 2002.

POMAR, C. A. et al. Maternal diet, rather than obesity itself, has a main influence on milk triacylglycerol profile in dietary obese rats. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1865, n. 2, p. 158556, 2020.

POWE, C. E. et al. Effects of recombinant human prolactin on breast milk composition. **Pediatrics**, v. 127, n. 2, 2011.

RICHERT, M. M. et al. An atlas of mouse mammary gland development. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 5, n. 2, p. 227–241, 2000.

ROLLINS, N. C. et al. Why invest, and what it will take to improve breastfeeding practices? **The Lancet**, v. 387, n. 10017, p. 491–504, 2016.

RUDOLPH, M. C. et al. Prolactin-mediated regulation of lipid biosynthesis genes in vivo in the lactating mammary epithelial cell. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 300, n. 6, p. 1059–1068, 2011.



- SAVAGE, K. et al. GABA-modulating phytochemicals for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 1, p. 3–18, 2018.
- SEIDLER-LOZYKOWSKA, K.; MIELCAREK, S.; BARANIAK, M. Content of essential oil and valerenic acids in valerian (*valeriana officinalis* L.) roots at the selected developmental phases. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 5, p. 413–416, 2009.
- SEVRIN, T. et al. Use of water turnover method to measure mother's milk flow in a rat model: Application to dams receiving a low protein diet during gestation and lactation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–13, 2017.
- SEVRIN, T. et al. Impact of fenugreek on milk production in rodent models of lactation challenge. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 1–21, 2019.
- SILVA, F. V. et al. Chamomile reveals to be a potent galactagogue: the unexpected effect. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 31, n. 1, p. 116–118, 2018.
- SIM, T. F. et al. The use, perceived effectiveness and safety of herbal galactagogues during breastfeeding: A qualitative study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 9, p. 11050–11071, 2015.
- SINGH, R. Medicinal Plants: A Review. **Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 1, p. 50, 2015.
- SRIRAMAN, N. K. The Nuts and Bolts of Breastfeeding: Anatomy and Physiology of Lactation. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 47, n. 12, p. 305–310, 2017.
- STINNAKRE, M. G. et al. Creation and phenotypic analysis of  $\alpha$ -lactalbumin-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 14, p. 6544–6548, 1994.
- TABARES, F. P.; JARAMILLO, J. V. B.; RUIZ-CORTÉS, Z. T. Pharmacological Overview of Galactagogues. v. 2014, 2014a.
- TABARES, F. P.; JARAMILLO, J. V. B.; RUIZ-CORTÉS, Z. T. Pharmacological Overview of Galactagogues. **Veterinary Medicine International**, v. 2014, 2014b.
- TABRIZI, S. O.; MIRGHAFORVAND, M.; SEYEDI, R. The effect of metoclopramide on prolactin levels in breastfeeding mothers: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Pediatrics**, v. 5, n. 10, p. 5827–5838, 2017.
- TELANG, S. Lactoferrin: A critical player in neonatal host defense. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1–16, 2018.
- THREADGOLD, L. G.; KUHN, N. J. Monosaccharide transport in the mammary gland of the intact lactating rat. **Biochemical Journal**, v. 218, n. 1, p. 213–219, 1984.
- TONG, J. J. et al. Effect of the concentration of circulating prolactin on dairy cows' responsiveness to domperidone injection. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 2579–

2587, 2018.

TRINDER, T. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann. din. Biochem.**, p. 24–27, 1969.

UNICEF. Breastfeeding: A mother's gift, for every child. 2018a.

UNICEF. Breastfeeding a mother's gift, for every child. 2018b.

UNICEF; WHO. **Breastfeeding and Early Childhood Development**. [s.l.: s.n.].

UPADHYAY, S. et al. Recent advances in steroidal saponins biosynthesis and in vitro production. **Planta**, v. 248, n. 3, p. 519–544, 2018.

VARAS, S. M. et al. Hyperthyroidism and production of precocious involution in the mammary glands of lactating rats. **Reproduction**, v. 124, n. 5, p. 691–702, 2002.

VERHEUL, F. E. et al. Simplified and rapid methods for the determination of protein, fat and lactose in human milk and the energy intake by the breast-fed infant. **Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry. Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie**, v. 24, n. 5, p. 341–6, 1986.

VICTORA, C. G. et al. Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **The Lancet**, v. 387, n. 10017, p. 475–490, 2016.

WAGNER, C. L. et al. Analytical considerations and general diagnostic and therapeutic ramifications of milk hormones during lactation. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 5–16, 2018.

WAGNER, C. L. et al. The Safety of Mother's Milk® Tea: Results of a Randomized Double-Blind, Controlled Study in Fully Breastfeeding Mothers and Their Infants. **Journal of Human Lactation**, v. 35, n. 2, p. 248–260, 2019.

WAGNER, H.; BLAD, S.; RICKL, V. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2001.

WALL, E.; MCFADDE, T. Regulation of Mammary Development as It Relates to Changes in Milk Production Efficiency. **Milk Production - An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health**, 2012.

WATSON, C. J.; KREUZALER, P. A. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. **International Journal of Developmental Biology**, v. 55, n. 7–9, p. 757–762, 2011.

WHEATLEY, D. Medicinal plants for insomnia: A review of their pharmacology, efficacy and tolerability. **Journal of Psychopharmacology**, v. 19, n. 4, p. 414–421, 2005.

WHO. Global targets 2025. **Global targets 2025**, p. 50, 2014.

WILLIAMSON, D. H. Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. **FEBS**

**Letters**, v. 117, n. August, p. K93–K105, 1980.

WINTER, J.; JUREK, B. The interplay between oxytocin and the CRF system: regulation of the stress response. **Cell and Tissue Research**, v. 375, n. 1, p. 85–91, 2019.

WITKOWSKA-ZIMNY, M.; KAMINSKA-EL-HASSAN, E. Cells of human breast milk. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Long-term health effects of breastfeeding** WHO Library Cataloguing. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18198630>>.

YUAN, T. et al. Triacylglycerol Composition of Breast Milk during Different Lactation Stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 2272–2278, 2019.

ZAIA, D. A.; ZAIA, C. T. Determinação de Proteínas Totais via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes. **Química Nova**, v. 21, 1998.

ZAMIRI, M. J.; QOTBI, A.; IZADIFARD, J. Effect of daily oxytocin injection on milk yield and lactation length in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 40, n. 2, p. 179–185, 2001.

ZECCA, E. et al. Efficacy of a galactagogue containing silymarin-phosphatidylserine and galega in mothers of preterm infants: A randomized controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 10, p. 1151–1154, 2016.

ZHAO, F. Q. Biology of glucose transport in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 19, n. 1, p. 3–17, 2014.

## ANEXO A – Reveladores para CCD

- Ferrocianeto de potássio 1% (m/v) (WAGNER; BLADT. 2001): A solução foi preparada pela dissolução de 0.10 g de ferrocianeto de potássio em 10 mL de água destilada e foi armazenada a -4°C.
- Cloreto de Ferro III 2% (m/v) (WAGNER; BLADT. 2001): O reagente foi preparado pela adição de 0.20 g de cloreto de ferro a 10 mL de água destilada e guardou-se a -4°C.
- Reagente de Liebermann-Burchard (WAGNER; BLADT. 2001): O reagente foi preparado pela adição cuidadosa de 5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico a 50 mL de etanol. enquanto se arrefece em gelo. O reagente foi preparado na altura do ensaio. devido à sua instabilidade.
- Reagente de Wagner (BROSSI. 1988): O reagente foi preparado pela dissolução de 1 g de iodo e 10 g de iodeto de potássio em 50 mL de água destilada e pela adição de 2 mL de ácido acético glacial. O volume foi completo até 100 mL com água destilada.

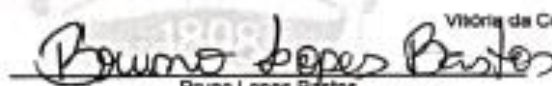
## ANEXO B – Comitê de ética



Universidade Federal da Bahia  
 Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira  
 COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS  
 (CEUA - IMS/CAT - UFBA)



PROJETO DE PESQUISA - Protocolo 063/2018 - Apreciação em 19/03/2019 - Aprovado sem restrições
<p><b>Título:</b> Avaliação da atividade galactagoga do extrato etanólico de <i>Valeriana officinalis</i>, em modelo experimental com ratas.</p> <p><b>Protocolo:</b> 063/2018</p> <p><b>Pesquisador:</b> Regiane Yatsuda</p> <p><b>Instituição:</b> Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira – UFBA</p>
CERTIFICADO
<p>A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA - IMS/CAT - UFBA) certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação da atividade galactagoga do extrato etanólico de <i>Valeriana officinalis</i>, em modelo experimental com ratas, Protocolo nº 063/2018, da pesquisadora Regiane Yatsuda, que foi submetido à avaliação desta Comissão, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foi aprovado na 22ª Reunião Ordinária do dia 19 de dezembro de 2018.</p>
CERTIFICATE
<p>The Committee on Ethics in Animal Use (CEUA - IMS / CAT - UFBA) certifies that the research project "Evaluation of the galactagogue activity of the ethanolic extract of <i>Valeriana officinalis</i>, in an experimental model with rats " Protocol nº 063/2018 of the researcher Regiane Yatsuda who was submitted to the evaluation of this Commission is in accordance with the ethical principles of animal experimentation and was approved at the 22th ordinary meeting on 12/19/2018.</p>

  
 Bruno Lopes Bastos  
 Coordenador CEUA - IMS/CAT – UFBA

Vitória da Conquista, 19 de março de 2019.

## ANEXO C – Avaliação comportamento da rata

Avaliação da rata durante a amamentação	
Presença de piloereção	<input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Pouco. <input type="checkbox"/> Intermediário. <input type="checkbox"/> Excessivo. <input type="checkbox"/> Não.
Alteração da atividade locomotora	<input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Pouco. <input type="checkbox"/> Intermediário. <input type="checkbox"/> Excessivo. <input type="checkbox"/> Não.
Diarreia	<input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Pouco. <input type="checkbox"/> Intermediário. <input type="checkbox"/> Excessivo. <input type="checkbox"/> Não.
Organização e manutenção do ninho	<input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Não.
Recolher e lambar os filhotes	<input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Não. Quantos? _____.
Exclui filhote do ninho	<input type="checkbox"/> Sim. Quantos? _____. <input type="checkbox"/> Não.
Amamentou todos os filhotes ao mesmo tempo?	<input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Não. Quantos? _____. OBS. _____.
Tempo de amamentação	
A mãe se alimentou e bebeu água durante o período	<input type="checkbox"/> Sim. Tempo: _____. <input type="checkbox"/> Não.
Morte	<input type="checkbox"/> Sim. Horário: _____. <input type="checkbox"/> Não.