



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA-AMAPÁ
INSTITUTO DE PESQUISAS CIENTÍFICAS E TECNOLÓGICAS DO ESTADO DO AMAPÁ
CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE TROPICAL
UNIFAP/ EMBRAPA-AP/IEPA/CI-BRASIL/PPGBIO

BEATRIZ MARTINS DE SÁ

ESTUDO DA TOXIDADE NÃO CLÍNICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS
CASCAS DO CAULE DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

MACAPÁ – AP

2014

BEATRIZ MARTINS DE SÁ

**ESTUDO DA TOXIDADE NÃO CLÍNICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS
CASCAS DO CAULE DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Linha de Pesquisa: Uso sustentável da biodiversidade.

Orientador: Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho

MACAPÁ – AP

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.32

S111e Sá, Beatriz Martins de.

Estudo da toxicidade não clínica do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec / Beatriz Martins de Sá; orientador, José Carlos Tavares Carvalho. -- Macapá, 2014.
145 f.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, 2014.

1. Plantas medicinais. 2. *Endopleura uchi*. 3. Toxicidade subcrônica. 4. Toxicidade reprodutiva. 5. Ratos Wistar. I. Carvalho, José Carlos Tavares, (orient). II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

BEATRIZ MARTINS DE SÁ

**ESTUDO DA TOXIDADE NÃO CLÍNICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS
CASCAS DO CAULE DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Linha de Pesquisa: Uso sustentável da biodiversidade.

Banca Avaliadora:

Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes - UNIFAP

Profa. Dra. Deyse de Sousa Dantas - UNIFAP

Orientador:

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho (UNIFAP)

Macapá-AP, 25 de agosto de 2014

Dedico este trabalho à minha família, em especial ao meu esposo Danilo Hyacienth e em memória de meu filho Bernardo de Sá Hyacienth. Bernardo, você certamente sempre estará em minhas lembranças e em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu DEUS que com seu manto de amor me protegeu e fortaleceu durante toda minha caminhada.

Aos amigos da turma de mestrado (2012) do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (Aristides Sobrinho, Cíntia Togura, Emanuelle Pinto, Erika Kzan, Gabrielly Ribeiro, Huann Carillo e Lia Kajiki), pelo companheirismo nos momentos alegres e difíceis que atravessamos.

À Universidade Federal do Amapá, através do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBio).

Ao amigo e Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho, que com humildade e dedicação se tornou um exemplo de pesquisador competente. Obrigada por me orientar desde a iniciação científica e hoje me ajudar a subir mais um degrau do conhecimento.

À Professora Dra. Tânia Toledo de Oliveira da Universidade Federal de Viçosa - MG (UFV), pela parceria na realização do teste subcrônico realizado no Laboratório de Biofármacos.

Aos meus amados pais Eliete Sá e Benedito Sá e padrasto Benedito Medeiros pela presença constante, pelas palavras afetivas durante os momentos mais difíceis e pelo carinhoso e inestimável auxílio e incentivo.

Às minhas queridas irmãs, Elielma Sá, Elizangela Sá, Erica Sá, Sandra Sá e Cleide Jane Sá, pelo amoroso convívio, pelo constante apoio, pela compreensão e pelo auxílio carinhoso.

Ao meu esposo Danilo Hyacienth, pela paciência quando da leitura das versões ainda incipientes e pelas críticas pertinentes. Além da companhia as constantes idas ao Laboratório de Pesquisa em Fármacos, inclusive sábados, domingos e feriados para a realização dos protocolos experimentais.

À amiga e companheira de trabalho Clarissa Silva Lima pela ajuda prestada durante a condução desse trabalho.

Gostaria de agradecer aos colegas o estímulo, apoio e ensinamentos. Em especial, cabem agradecimentos ao grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Fármacos (Adriana Maciel, Gisele Custódio, Jonatas Lobato, Helison Oliveira, Uriel Davi, Charles Barros, Clarice Rocha, Jéssica Vilhena, Benedito Júnior, Mayara Tânia e Clarissa Lima).

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida;

A todas as pessoas que me apoiaram e acreditaram em mim, possibilitando a concretização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, “planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro.”

Jeremias 29:11

RESUMO

O Brasil é considerado o primeiro em megadiversidade, por apresentar uma variedade de ecossistemas, com destaque para a floresta amazônica, a maior floresta tropical úmida do planeta. Um dos grandes desafios da atualidade é planejar o uso racional e sustentável da Amazônia, garantindo assim o desenvolvimento social e econômico aliado à conservação de sua biodiversidade. Desde as mais antigas civilizações que as plantas são utilizadas como fitoterápicos, no entanto, ao longo do tempo percebeu-se que determinadas plantas apresentavam substâncias potencialmente perigosas e, por esta razão, deveriam ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos. Para a maioria das plantas medicinais não há dados sobre a segurança de seu uso durante a gravidez. *Endopleura uchi* é uma espécie da floresta de terra firme. O chá do caule é utilizado na medicina popular para o tratamento de artrite, reumatismo, colesterol, diabetes e inflamações uterinas. Apesar de alguns dados da literatura demonstrar sua eficácia para várias atividades biológicas, até o momento os estudos toxicológicos realizados não sustentam a segurança do seu uso. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a possível toxicidade não clínica do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. uchi* (EHEEu) com a dose de 500 mg/kg, após longo período de tratamento (toxicidade subcrônica), assim como após a exposição durante os períodos de pré-implantação, organogênese e fetal em ratos Wistar (toxicologia reprodutiva). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que na toxicidade subcrônica, o EHEEu (500 mg/kg) não alterou os parâmetros bioquímicos, hematológicos, desenvolvimento ponderal e consumo de água e ração dos animais. No período de pré-implantação, o EHEEu não interferiu negativamente nos parâmetros reprodutivos maternos e contagem dos pontos de ossificação, nem causou toxicidade materna, embriofetotoxicidade e teratogenicidade na prole. Quanto ao período de organogênese, também não produziu toxicidade nas progênitoras, não alterou a contagem dos pontos de ossificação, assim como não causou embriofetotoxicidade e teratogenicidade na prole, entretanto, aumentou significativamente o número de perdas pós-implantes. No período de desenvolvimento fetal não provocou toxicidade nas progenitoras, não alterou os parâmetros reprodutivos maternos, não afetou o desenvolvimento ponderal, as características gerais dos descendentes e a atividade motora, (campo aberto), porém, as características sexuais das descendentes fêmeas foram afetadas significativamente. Portanto, os resultados permitem concluir que nos ensaios de toxicidade subcrônica o EHEEu apresentou segurança na dose e no período em que os animais foram expostos. Nos ensaios de toxicidade reprodutiva, o EHEEu também mostrou segurança no período de pré-implantação do blastocisto no útero, no período de organogênese apesar de alterar as perdas pós-implantes, não alterou significativamente nenhum dos outros parâmetros analisados. No período de desenvolvimento fetal, mostrou-se seguro, apenas alterando as características sexuais das fêmeas. Dessa forma, sugere-se a continuação de estudos relacionados à segurança de *E. uchi*, utilizando outras doses e outras espécies de animais.

Palavras-chave: *Endopleura uchi*. Toxicidade Subcrônica. Toxicologia Reprodutiva. Ratos Wistar.

ABSTRACT

Brazil is considered the top one in mega diversity, for presenting a variety of ecosystems, where Amazon forest is its icon, the largest humid tropical forest of the planet, however, one of the great challenges today is to plan the rational and sustainable use of the Amazon, assuring its social and economical development to the conservation of this biodiversity. Since the most ancient civilizations, plants are used as Phytoterapic, however, along the time it has been observed that certain plants presented substances potentially dangerous and, for this reason, they should be used carefully, respecting their toxicological risks. For most of the medicinal plants there are no data on the safety of its use during the pregnancy. *Endopleura uchi* is a type from the terra firme forest. The tea of the stem is used in the folk medicine for the arthritis treatment, rheumatism, cholesterol, diabetes and uterine inflammations. In spite of some data of the literature demonstrate its effectiveness for several biological activities; the accomplished toxicological studies do not sustain the safety of its use so far. In this sense, the present study had as objective to evaluate the possible non-clinic toxicity hydroethanolic extract of the peels of the stem of *E. uchi* (EHEEu) with a dose of 500 mg/kg, after a long treatment period (subchronic toxicity), as well as after the exhibition during the pre-implantation periods, organogenesis and fetal in female Wistar rats (reproductive toxicology). The results showed that in the sub-chronic toxicity, EHEEu (500 mg/kg) did not change the biochemical, hematological, weighted development parameters and water intake and the animals' food. In the pre-implantation period, EHEEu did not interfere negatively neither in the reproductive maternal parameters and counting of the ossification points, nor it caused maternal toxicity, embryofetotoxicity and teratogenicity in the offspring. For the organogenesis period, it did not also produce toxicity in the progenitors, it did not change the counting of the ossification points, as well it did not cause embryofetotoxicity and teratogenicity in the offspring, and however, it rose significantly the number of losses post-implant. In the period of fetal development it did not cause toxicity in the progenitors, it did not change the maternal reproductive parameters, it did not affect the weighted development, the descendants' general characteristics and the motor activity, (open field), however, the female descendants' sexual characteristics were affected significantly. Consequently, the results show that in the samples of subchronic toxicity EHEEu presented safety in the dose and in the period that the animals were exposed. In the samples of reproductive toxicity, EHEEu also showed safety in the period of pre-implantation of the blastocyst in the uterus, in the organogenesis period in spite of changing the losses post-implant; it did not change any of the other analyzed parameters significantly. In the period of fetal development, safety has been shown; change only the sexual characteristics of the female. In this sense, it is recommended the continuation of studies related to the safety of *E. uchi*, using other dosages and other animal species.

Keywords: *Endopleura uchi*. Subchronic Toxicity. Reproductive Toxicology. Wistar Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Menino recém-nascido apresentando membros tipicamente malformados (meromelia – encurtamento dos membros) causados pelo sedativo talidomida.....	30
Figura 2 - Ilustração mostrando o risco crescente do desenvolvimento de anomalias congênitas durante a organogênese.....	32
Figura 3 – Distribuição geográfica de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.....	37
Figura 4 – <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.....	38
Figura 5 – Casca do caule de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.....	38
Figura 6 - Frutos de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.....	39
Figura 7 - Estruturas químicas de <i>Endopleura uchi</i> (Huber). Cuatrec. A) Bergenina; B) 8,10 Dimetoxibergenina.....	41
Figura 8 – Acetilbergenina.....	44

CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DA TOXIDADE SUBCRÔNICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, EM RATOS WISTAR.

Figura 1 - Curva padrão do ácido pirogálico por espectrofotometria ($\lambda=760$ nm), concentrações de 0,01 a 0,05 mg/mL submetidas a reação com o ácido fosfomolibdotúngstico em meio alcalino com leitura após 2 minutos de reação. A regressão linear dos resultados obteve coeficiente de correlação $r^2= 0.9987$ com a equação da reta $y= 10.450x- 0.0118$	58
Figura 2 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratos (machos e fêmeas), linhagem Wistar, por 22 dias consecutivos. No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). $*p<0.05$ comparado ao grupo controle.....	59
Figura 3 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o consumo diário de água (mL) de ratos (machos e fêmeas), linhagem Wistar, por 22 dias consecutivos. No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). $*p<0.05$ comparado ao grupo	

controle.....	60
Figura 4 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o consumo diário de ração (g) de ratos (machos e fêmeas), linhagem Wistar, por 22 dias consecutivos. No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * <i>p</i> <0.05 comparado ao grupo controle.....	60

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA TOXIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, EM RATAS WISTAR, NO PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO E ORGANOGÊNESE.

Figura 1 - Estante ventilada utilizada para acondicionar os animais durante todas as fases experimentais	75
Figura 2 - Ovário de rata Wistar no 21º dia de prenhez. As setas indicam corpos lúteos gravídicos.....	79
Figura 3 - Útero gravídico de rata Wistar no 21º dia de prenhez. As setas indicam pontos de implantação uterina.....	79
Figura 4 - Análise das anomalias e/ou malformações externas dos RNs de rata Wistar no 21º dia de prenhez.....	82
Figura 5 - Processamento e análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas dos RNs de rata Wistar no 21º dia de prenhez.....	83
Figura 6 - Processamento dos RNs de rata Wistar no 21º dia de prenhez.....	84
Figura 7 - Secções seriadas de Wilson (1965) de rata Wistar no 21º dia de prenhez.....	85
Figura 8 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pré-implantação (d0-d5), e após o tratamento (d6-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * <i>p</i> <0.05 comparado ao grupo controle.....	93
Figura 9 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o consumo hídrico (mL) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pré-implantação (d0-d5), e após o tratamento (d6-	

d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). *p<0.05 comparado ao grupo controle.....	93
Figura 10 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o consumo de ração (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pré-implantação (d0-d5), e após o tratamento (d6-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). *p<0.05 comparado ao grupo controle.....	95
Figura 11 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre recém-nascidos de progenitoras, tratadas durante o período de pré-implantação (d0-d5). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). PIP: Pequeno para Idade de Prenhez; AIP: Adequado para Idade de Prenhez; GIP: Grande para Idade de Prenhez. Os dados representam a média ± E.P.M. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher. *p<0.05 comparado ao grupo controle.....	97
Figura 12 – Anomalia Esquelética (5° esternóbrio rudimentar) (EIGI). (A) 5° Esternóbrio Normal (EIGI). (B) 5° Esternóbrio Rudimentar (EIGII).....	100
Figura 13 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15), e após o tratamento (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). *p<0.05 comparado ao grupo controle.....	102
Figura 14 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o consumo hídrico (mL) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15), e após o tratamento (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). *p<0.05 comparado ao grupo controle.....	103
Figura 15 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o consumo de ração (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15), e após o tratamento (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores	

representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). *p<0.05 comparado ao grupo controle.....	104
Figura 16 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre recém-nascidos de progenitoras, tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). PIP: Pequeno para Idade de Prenhez; AIP: Adequado para Idade de Prenhez; GIP: Grande para Idade de Prenhez. Os dados representam a média ± E.P.M. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher. *p<0.05 comparado ao grupo controle.....	106
Figura 17. Malformação visceral (ausência de testículo) A. Testículos normais (EIIGII) e B. Ausência de testículo (EIIGII) (ponta da seta).....	108

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA TOXIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, EM RATAS WISTAR, NO PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO FETAL.

Figura 1 - Figura 1 – Tratamento via oral dos animais.....	124
Figura 2 – Progênie avaliada durante o período de lactação.....	126
Figura 3 – Avaliação do descolamento dos pavilhões auriculares da progênie durante o período de lactação.....	127
Figura 4 – Avaliação do aparecimento de penugem e pêlos da progênie durante o período de lactação. (A) Penugem. (B) Pêlos.....	128
Figura 5 – Avaliação da abertura palpebral ocular bilateral da progênie durante o período de lactação.....	128
Figura 6 – Avaliação da erupção dos incisivos da progênie durante o período de lactação....	129
Figura 7 - Caixa de madeira utilizada para a realização do teste de comportamento em campo aberto.....	130
Figura 8 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 5/grupo). *p<0.05 comparado ao grupo controle.....	133
Figura 9 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de	

Endopleura uchi (500 mg/kg), sobre a ingestão de água (mL) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 5/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle..... 134

Figura 10 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o consumo de ração (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, , tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 5/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle..... 135

Figura 11 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento ponderal (lactação) da progênie de ratas tratadas no período de desenvolvimento fetal (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o Teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 5/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle..... 137

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DA TOXIDADE SUBCRÔNICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, EM RATOS WISTAR.

Tabela 1 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu (22 dias consecutivos), preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre os parâmetros bioquímicos de ratos (machos e fêmeas), linhagem Wistar.....	61
Tabela 2 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu (22 dias consecutivos), preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre os parâmetros hematológicos de ratos (machos e fêmeas), linhagem Wistar.....	63

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA TOXIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, EM RATAS WISTAR, NO PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO E ORGANOGÊNESE.

Tabela 1 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre a performance reprodutiva materna de ratas prenhas tratadas durante o período de pré-implantação (d0 – d5).....	96
Tabela 2 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre a frequência das anomalias e malformações externas e internas (esqueléticas e viscerais) em recém-nascidos e ninhadas de ratas tratadas durante o período de pré-implantação (d0 – d6).....	98
Tabela 3 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o percentual das anomalias internas (esqueléticas e viscerais) em recém-nascidos e ninhadas de ratas tratadas durante o período de pré-implantação (d0 – d6).....	99
Tabela 4 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre os pontos de ossificação em recém-nascidos de ratas tratadas durante o período de pré-implantação (d0 – d6).....	100
Tabela 5 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre a performance reprodutiva materna de ratas prenhas tratadas durante o período de pós-implantação (d6 – d15).....	105

Tabela 6 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre a frequência das anomalias e malformações externas e internas (esqueléticas e viscerais) em recém-nascidos e ninhadas de ratas tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15).....	107
Tabela 7 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o percentual das anomalias e malformações externas e internas (esqueléticas e viscerais) em recém-nascidos e ninhadas de ratas tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15).....	108
Tabela 8 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre os pontos de ossificação em recém-nascidos de ratas tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15).....	109

CAPÍTULO 3 –AVALIAÇÃO DA TOXIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, EM RATAS WISTAR, NO PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO FETAL.

Tabela 1 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre a performance reprodutiva materna de ratas prenhas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20).....	136
Tabela 2 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento geral da progênie de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20).....	138
Tabela 3 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre a atividade motora da progênie de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20).....	139
Tabela 4 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre a avaliação sexual dos descendentes (machos e fêmeas) de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20).....	140
Tabela 5 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> (500 mg/kg), sobre a regulação do ciclo estral por um período de 15 dias, das descendentes fêmeas de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20).....	141
Tabela 6 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de	

Endopleura uchi (500 mg/kg), sobre a duração de cada fase do ciclo estral por um período de 15 dias, das descendentes fêmeas de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20)..... 141

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Posicionamento taxonômico de <i>E. uchi</i>	36
---	----

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA TOXIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, EM RATAS WISTAR, NO PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO E ORGANOGÊNESE.

Quadro 1 - Grupos experimentais para avaliar a performance reprodutiva de <i>Rattus norvegicus albinus</i> , linhagem Wistar, fêmeas, tratados com o EHEEu e água destilada.....	74
Quadro 2 - As quatro fases do ciclo estral de <i>Rattus norvegicus albinus</i> (fêmeas), mediante exame de citologia vaginal.....	76
Quadro 3 - Anomalias e malformações investigadas no exame esquelético.....	83
Quadro 4 - Secções seriadas de Wilson (1965).....	85

CAPÍTULO 3 –AVALIAÇÃO DA TOXIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, EM RATAS WISTAR, NO PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO FETAL.

Quadro 1 - Grupo experimental para avaliar a performance reprodutiva de <i>Rattus norvegicus albinus</i> , linhagem Wistar, fêmeas, tratados com o EHEEu e água destilada.....	122
Quadro 2 - As quatro fases do ciclo estral de <i>Rattus norvegicus albinus</i> (fêmeas), mediante exame de citologia vaginal.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

AIP	Adequado para Idade de Prenhez
FA	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CDB	Convenção Sobre Diversidade Biológica
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CI	Concentração Inibitória
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm²	Centímetro Quadrado
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
DE	Dose efetiva
dL	Decilitro
DL	Dose Letal
EMBRAPA	Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
EXP	Experimento
FDA	Food and Drug Administration
fl	Fentolitro
g	Gramma
G	Grupo
GIP	Grande para Idade de Prenhez
HDL	High Density Lipoprotein
IP	Índice Placentário
Kg	Kilograma
LACEN-AP	Laboratório Central do Amapá
LH	Hormônio Luteinizante
m²	Metro Quadrado
MCHC	Concentração De Hemoglobina Corpuscular Média
mg	Miligramma
mL	Mililitro

mm	Milímetro
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PF	Peso Fetal
PIP	Pequeno para Idade de Prenhez
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PP	Peso Placentário
PPGBio	Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNs	Recém-Nascidos
U/l	Unidades por litro
UFPA	Universidade Federal Do Pará
UFV	Universidade Federal De Viçosa
UNICAMP	Universidade de Campinas
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
US EPA	United States Environmental Protection Agency
µl	Micro litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
2.1 BIODIVERSIDADE E USO SUSTENTÁVEL	28
2.2 TERATOLOGIA	29
2.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL.....	31
2.4 TOXICOLOGIA REPRODUTIVA.....	33
2.5 PLANTAS MEDICINAIS E TOXICOLOGIA REPRODUTIVA.....	34
2.6 <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.....	36
2.6.1 Posicionamento taxonômico da espécie botânica <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.	36
2.6.2 Principais características da espécie botânica <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.	37
2.6.3 Importância da espécie botânica <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.	39
2.6.4 Constituintes químicos e atividades biológicas da espécie botânica <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.	41
REFERÊNCIAS.....	45
3 OBJETIVOS.....	50
3.1 GERAL	50
3.2 ESPECÍFICOS	50
CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA TOXIDADE SUBCRÔNICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec, EM RATOS WISTAR... 51	
RESUMO.....	52
ABSTRACT.....	53
1 INTRODUÇÃO.....	54
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 MATERIAL BOTÂNICO	55
2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....	55
2.3 ANÁLISE DO TEOR DE POLIFENÓIS E TANINOS TOTAIS.....	55
2.4 ANIMAIS	56
2.4.1 Tratamento dos animais e avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	56
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	65
CAPITULO 2: AVALIAÇÃO DA TOXIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec, EM RATAS WISTAR, NO PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO E ORGANOGÊNESE.....	68
RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	70
1 INTRODUÇÃO.....	71
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1 MATERIAL BOTÂNICO	73
2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....	73
2.3 DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS.....	73
2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	74
2.5 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL	74
2.5.1 Período de adaptação	74
2.5.2 Identificação das fases do ciclo estral das ratas.....	75
2.5.3 Período de acasalamento	77
2.6 EXPERIMENTO I - EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO DE PRÉ- IMPLANTAÇÃO	77
2.6.1 Período de tratamento (d0 – d5)	77
2.6.2 Avaliação da toxidade aguda nas progenitoras	78
2.6.3 Avaliação do desenvolvimento ponderal das progenitoras	78
2.6.4 Avaliação do consumo de água e ração das progenitoras.....	78
2.6.5 Avaliação da performance reprodutiva	78
2.6.5.1 Perdas pré-implantes.....	78
2.6.5.2 Perdas pós-implantes.....	80
2.6.5.3 Índice de reabsorções.....	80
2.6.5.4 Índice de parto.....	80
2.6.5.5 Índice de nascimento.....	80
2.6.5.6 Peso dos fetos, das placentas e índice placentário.....	80
2.6.6 Avaliação da embriofetotoxicidade	81
2.6.6.1 Peso e classificação dos recém-nascidos (RNs).....	81
2.6.7 Teratogenicidade	81
2.6.7.1 Análise das anomalias e/ou malformações externas.....	81

2.6.7.2	Análise das anomalias e/ou malformações internas.....	82
2.6.7.2.1	<i>Processamento, análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas e contagem dos pontos de ossificação.....</i>	82
2.6.7.2.2	<i>Processamento e análise das anomalias e/ou malformações viscerais</i>	84
2.7	EXPERIMENTO II – EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO DE ORGANOGÊNESE	89
2.7.1	Período de tratamento (d6-d15).....	89
2.7.2	Avaliação da toxicidade aguda nas progenitoras	89
2.7.3	Avaliação do desenvolvimento ponderal das progenitoras	89
2.7.4	Avaliação do consumo de água e ração das progenitoras.....	89
2.7.5	Avaliação da performance reprodutiva	89
2.7.5.1	Perdas pré-implantes.....	90
2.7.5.2	Perdas pós-implantes.....	90
2.7.5.3	Índice de reabsorções.....	90
2.7.5.4	Índice de parto.....	90
2.7.5.5	Índice de nascimento.....	90
2.7.5.6	Peso dos fetos, das placentas e índice placentário.....	90
2.7.6	Avaliação da embriofetotoxicidade	90
2.7.6.1	Peso e classificação dos recém-nascidos (RNs).....	90
2.7.7	Teratogenicidade	90
2.7.7.1	Análise das anomalias e/ou malformações externas.....	91
2.7.7.2	Análise das anomalias e/ou malformações internas.....	91
2.7.7.2.1	<i>Processamento, análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas e contagem dos pontos de ossificação.....</i>	91
2.7.7.2.2	<i>Processamento e análise das anomalias e/ou malformações viscerais</i>	91
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	91
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
3.1	EXPERIMENTO I - EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO DE PRÉ-IMPLANTAÇÃO	92
3.1.1	Avaliação da toxicidade aguda nas progenitoras EI.....	92
3.1.2	Avaliação do desenvolvimento ponderal das progenitoras EI	92
3.1.3	Avaliação do consumo de água e ração das progenitoras EI	93
3.1.4	Performance reprodutiva materna EI.....	95
3.1.5	Embriofetotoxicidade EI	97
3.1.6	Teratogenicidade EI.....	98

3.1.6.1	Análise das anomalias e/ou malformações externas e internas (esqueléticas e viscerais) EI.....	98
3.1.6.2	Contagem dos pontos de ossificação EI.....	100
3.2	EXPERIMENTO II - EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO PÓS-IMPLANTAÇÃO	101
3.2.1	Avaliação da toxicidade aguda nas progenitoras EII	101
3.2.2	Avaliação do desenvolvimento ponderal das progenitoras EII.....	102
3.2.3	Avaliação do consumo de água e ração das progenitoras EII.....	102
3.2.4	Performance reprodutiva materna EII	104
3.2.5	Embriofetotoxicidade EII.....	106
3.2.6	Teratogenicidade EII	106
3.2.6.1.	Contagem dos pontos de ossificação.....	108
4	CONCLUSÃO.....	110
	REFERÊNCIAS.....	111
	CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA TOXIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec, EM RATAS WISTAR NO PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO FETAL.....	116
	RESUMO.....	117
	ABSTRACT.....	118
1	INTRODUÇÃO.....	119
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	121
2.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	121
2.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO BRUTO	121
2.3	DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS.....	121
2.4	GRUPO EXPERIMENTAL	122
2.5	SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL	122
2.5.1	Período de adaptação	122
2.5.2	Identificação das fases do ciclo estral das ratas.....	122
2.5.3	Período de Acasalamento	123
2.5.4	Período de Tratamento (d16 – d20).....	124
2.6	PARÂMETROS ANALISADOS	125
2.6.1	Avaliação da toxicidade aguda nas progenitoras	125
2.6.2	Avaliação do desenvolvimento ponderal das progenitoras	125
2.6.3	Avaliação do consumo de água e ração das progenitoras.....	125

2.6.4 Avaliação dos parâmetros reprodutivos das progenitoras.....	125
2.6.5 Avaliação da progênie.....	126
2.6.5.1 Avaliação do desenvolvimento ponderal da progênie.....	126
2.6.5.2 Desenvolvimento geral da progênie.....	126
2.6.5.2.1 <i>Descolamento dos pavilhões auriculares.....</i>	<i>127</i>
2.6.5.2.2 <i>Aparecimento de penugem e pêlos.....</i>	<i>127</i>
2.6.5.2.3 <i>Abertura palpebral ocular bilateral.....</i>	<i>128</i>
2.6.5.2.4 <i>Erupção dos incisivos.....</i>	<i>128</i>
2.6.5.3 Avaliação da atividade motora.....	129
2.6.5.4 Avaliação sexual da progênie.....	130
2.6.5.5 Avaliação do ciclo estral.....	131
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	131
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	132
3.1 TOXIDADE AGUDA NAS PROGENITORAS EIII	132
3.2 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO PONDERAL DAS PROGENITORAS EIII	132
3.3 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO DAS PROGENITORAS EIII	133
3.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DAS PROGENITORAS EIII	135
3.5 AVALIAÇÃO DA PROGÊNIE EIII.....	136
3.5.1 Desenvolvimento ponderal da progênie	136
3.5.2 Desenvolvimento geral da progênie	137
3.5.3 Avaliação da atividade motora da progênie	139
3.5.4 Avaliação sexual da progênie	139
3.5.5 Avaliação do ciclo estral	140
4 CONCLUSÃO.....	142
REFERÊNCIAS	143
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	145

1 INTRODUÇÃO GERAL

A biodiversidade é definida como o conglomerado dos seres vivos da flora e da fauna de uma determinada região, incluindo ainda os microorganismos, e suas composições genéticas, bem como o ecossistema em que vive, compreendendo a variabilidade de organismos vivos, diversidade de espécies, variedades de funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas, e variedade de ecossistemas (CÁUPER, 2006).

O Brasil é considerado o primeiro em megadiversidade, tanto em número de espécies quanto em níveis de endemismo (ALBAGLI, 2001), consequência da variedade de ecossistemas aqui existentes, com destaque para a floresta amazônica, a maior floresta tropical úmida do planeta. Porém, um dos grandes desafios da atualidade é planejar o uso racional e sustentável da Amazônia, garantindo assim o desenvolvimento social e econômico aliado à conservação de sua biodiversidade (RIBEIRO; LERDA, 2007). Lembrando que na velocidade em que ocorre o fenômeno de extinção das espécies vegetais, um enorme número de plantas (e microorganismos) com propriedades medicinais corre o risco de desaparecer antes de seu valor ser reconhecido (GARCIA, 1995).

Em consequência da disponibilidade desta megadiversidade, desde as mais antigas civilizações que as plantas são utilizadas como fitoterápicos, podendo-se dizer que se trata de uma das primeiras manifestações do homem para compreender a natureza (SILVA; CARVALHO, 2004). Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). É admirável que este conjunto de conhecimentos tenha subsistido durante milênios, aprofundando-se e diversificando-se, sem nunca, porém, cair totalmente no esquecimento (SILVA; CARVALHO, 2004).

Segundo Silva e Carvalho (2004) planta medicinal pode ser considerada toda planta, que administrada sob qualquer forma farmacêutica e por alguma via ao homem ou animal, exerce algum tipo de ação farmacológica sobre este. Essas plantas, segundo alguns autores, possuem um sistema imunológico rudimentar que proporciona o desenvolvimento de meios de defesa química contra o ataque de fungos, bactérias, insetos e alguns animais (CARVALHO, 2004). Nesse contexto, os produtos naturais são, na maioria das vezes, os metabólitos secundários das plantas (princípio ativo). Na prática medicinal, esses produtos tornaram-se agentes terapêuticos e/ou profiláticos úteis (CARVALHO, 1998; CARVALHO, 2004).

O uso tradicional de diversas plantas medicinais baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, fez com que poucas espécies fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Porém, ao longo do tempo percebeu-se que determinadas plantas apresentavam substâncias potencialmente perigosas e, por esta razão, deveriam ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2005).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, sendo que a toxicidade de plantas medicinais é considerada um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. Esse fato se dá devido as pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda serem incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2005).

Vale resaltar que a espécie escolhida para realização da pesquisa (*Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.) é bastante utilizada na medicina tradicional. Portanto, diante do exposto, percebeu-se que até o momento os estudos toxicológicos realizados não sustentam a segurança do seu uso, o que nos motivou a realizar este estudo. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a possível toxicidade não clínica do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. uchi* (500 mg/kg), após longo período de tratamento (toxicidade subcrônica), assim como após a exposição durante os períodos de pré-implantação, organogênese e fetal em ratas Wistar (toxicologia reprodutiva).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIVERSIDADE E USO SUSTENTÁVEL

Do ponto de vista brasileiro, acredita-se que a biodiversidade apresenta amplo potencial, podendo tornar-se uma vantagem comparativa do país no âmbito da geopolítica global, levando-se em conta: sua ampla disponibilidade de recursos biogenéticos, a tradição de sua ciência na área biológica, além do acervo de conhecimentos tradicionais acumulados pelas populações locais e pertinentes para o acesso à natureza e às aplicações dessa biodiversidade (ALBAGLI, 2001). A utilização da biodiversidade pelo homem se confunde com sua própria existência e a domesticação de espécies úteis está diretamente associada à civilização (CAVALHEIRO; DURIGAN, 2002).

Desde a década de 70, várias iniciativas internacionais vêm sendo tomadas para encontrar e propor novos caminhos na direção da exploração sustentável dos recursos biológicos, culminando com a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), já assinada e ratificada por 172 países, mas com a ausência dos EUA. Apesar de que não exista um entendimento claro do que seria o uso sustentável da biodiversidade, algumas características desse tipo de exploração de recursos biológicos podem ser apontadas: o uso sustentável deve assegurar a manutenção da diversidade genética das espécies exploradas, assim como, deve assegurar a manutenção da diversidade de espécies em áreas exploradas. Além de que parte dos recursos gerados a partir da exploração de produtos da biodiversidade deve reverter para a recuperação/preservação do meio ambiente (CAVALHEIRO; DURIGAN, 2002).

Juntos, os países latino-americanos possuem grande parte da biodiversidade do mundo. Só o Brasil possui cerca de 20-22% de todas as plantas existentes e micro-organismos. Contudo, estima-se que não mais de 25.000 espécies de plantas têm sido objeto de qualquer tipo de investigação científica. Apesar de muito rico em recursos naturais, estes países não tem usado corretamente sua grande biodiversidade em benefício de seu próprio desenvolvimento (CALIXTO, 2005). Assim, é de grande importância a valorização da diversidade biológica e da agregação de valor econômico aos produtos naturais provenientes dessa diversidade (ODALIA-RÍMOLI et al., 2000).

No que se refere à busca de novos produtos oriundos da diversidade biológica – a bioprospecção – permite agregar valor a espécies desconhecidas ou até agora pouco valoradas e pode ser feita em qualquer área, com qualquer espécie, e de forma suportável em qualquer ambiente. Mas, a um novo produto descoberto, pelo menos as três características da

exploração sustentável apontada acima devem ser consideradas, estabelecendo estudos adicionais ou complementares que permitam mapear e conservar a diversidade genética da espécie, conhecer seu ciclo reprodutivo, estoque natural, potencial econômico, envolvimento na cadeia alimentar, papel no ecossistema (ecofisiologia), estudos de manejo, entre outros, sem os quais não será possível falar em sustentabilidade (CAVALHEIRO; DURIGAN, 2002).

2.2 TERATOLOGIA

O desejo de conceber filhos saudáveis permeia toda a história da humanidade, assim como, a preocupação com o uso de alimentos e drogas na gestação existe desde os tempos mais remotos (SCHUMACHER, 2004; JELÍNEK, 2005). Nesse contexto, a teratologia é o ramo da ciência que estuda as causas, os mecanismos e os padrões de desenvolvimento anormal. Sendo que um conceito fundamental da teratologia é o de que certos estágios de desenvolvimento embrionário são mais vulneráveis a perturbação do que outros (MOORE; PERSAUD, 2008). Esses defeitos podem ser deformidades, rupturas, displasias ou malformações (HANSEN; YANKOWITZ, 2002). É importante notar que malformação não significa apenas formação anormal de tecidos, mas também anormalidades bioquímicas, podendo ser causadas pela ação direta de um agente tóxico sobre o feto ou através de ação sobre o organismo materno (BERNARDI, 1999).

Até a década de 1940, acreditava-se que os embriões humanos estavam desprotegidos de agentes ambientais, tais como drogas e vírus, pelas membranas extraembrionárias/fetais (âmnio e córion) e pelas paredes abdominal e do útero da mãe. Contudo, em 1941, foram publicados os primeiros casos bem documentados de que um agente ambiental (vírus da rubéola) poderia provocar perturbações graves do desenvolvimento, como catarata, se tivesse presente no desenvolvimento crítico do desenvolvimento dos olhos, coração e orelhas dos seres humanos. Outro caso presente na literatura, diz respeito a anomalias graves dos membros e de outras perturbações do desenvolvimento que foram encontradas em crianças de mães que tinham consumido o sedativo talidomida durante o início da gestação (MOORE; PERSAUD, 2008).

Esse medicamento era usado para diminuir náuseas em mulheres grávidas. Milhares de crianças malformadas nasceram de mulheres que ingeriram a talidomida durante a gestação. Defeitos significativos nos fetos foram causados com a ingestão de uma única dose. Os fetos expostos à talidomida apresentaram intestinos malformados, defeitos na audição, ausência de orelhas, anomalias renais e oculares. Porém, o fenótipo que mais chamou a atenção foi a

focomelia ou meromelia (Figura 1), uma síndrome caracterizada pela aproximação ou encurtamentos dos membros ao tronco do feto (SMITHELLS; NEWMAN, 1992).

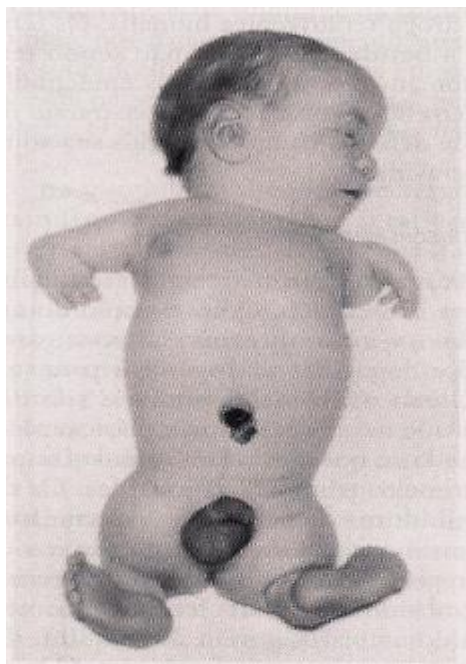


Figura 1 - Menino recém-nascido apresentando membros tipicamente malformados (meromelia – encurtamento dos membros) causados pelo sedativo talidomida.
Fonte: MOORE; PERSAUD (2008).

Segundo Moore e Persaud (2008) as causas de defeitos ao nascimento ou anomalias congênicas são frequentemente divididas em: fatores genéticos, como anormalidades cromossômicas; fatores ambientais, como drogas e vírus. Entretanto, muitas anomalias congênicas comuns são causadas por fatores genéticos e ambientais atuando em conjunto – herança multifatorial (fatores genéticos e ambientais agindo em conjunto de uma forma complexa).

Fatores genéticos são as causas mais comuns de anomalias congênicas, estima-se que eles causam cerca de um terço de todos os defeitos ao nascimento. Dois tipos de alterações ocorrem nos complementos cromossômicos: numéricos e estruturais. As alterações podem afetar os cromossomos sexuais e/ou os autossomos, contudo em alguns casos ambos os tipos de cromossomos podem ser afetados (MOORE; PERSAUD, 2008).

Embora os embriões humanos estejam bem protegidos no útero, agentes ambientais (teratógenos), podem causar perturbações no desenvolvimento após a exposição da mãe a eles (MOORE; PERSAUD, 2008). Assim, um agente teratogênico ou teratógeno é definido como qualquer substância, organismo, agente físico ou estado de carência que, estando presente durante a vida embrionária ou fetal, produz uma alteração na estrutura ou função da

descendência (OPITZ, 1982). Essas alterações podem se refletir como perda da gestação, malformações ou alterações funcionais (retardo de crescimento, por exemplo), ou ainda distúrbios neuro-comportamentais, como o retardo mental (KALTER, 2003). Entre os fatores ambientais existem os agentes infecciosos, como por exemplo, o vírus da rubéola, citomegalovírus e o parasita *Toxoplasma gondii*; os agentes químicos, envolvendo fármacos, por exemplo, talidomida, ácido retinóico, álcool e ácido valpróico; e os agentes físicos, como raios-X e radiação atômica (FAVERO, 2006).

Os estudos de teratogenicidade são realizados em sua grande maioria em animais e com isso, fornecem base de triagem para a verificação do potencial teratogênico de um determinado agente, sendo de grande importância para a compreensão dos princípios e mecanismos da teratogênese, porém, nem sempre esses estudos são bem sucedidos devido às diferenças genéticas entre as espécies (SCHARDEIN, 2000).

2.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL

Nogueira e Liberman (2002), afirmam que durante a gestação, ocorrem mudanças no sistema neuroendócrino com o intuito de se manter a saúde da mãe e de fornecer condições ideais para o desenvolvimento fetal. É necessário que uma complexa sequência de eventos adaptativos e mudanças hormonais sejam bem coordenados, para que assim, a gestação seja bem sucedida.

De acordo com Fritz e Giese (1990), a gestação em mamíferos pode ser dividida em três períodos: pré-implantação, organogênese e fetal. A fase de pré-implantação compreende o período que vai desde a fecundação até a implantação do blastocisto no útero, na espécie humana, esse período vai até o 17º dia pós-fecundação, enquanto que em ratos e camundongos, até o 6º dia (FRITZ; GIESE, 1990). Alterações em estágio na sequência desses eventos podem causar a morte do zigoto (MOORE; PERSAUD, 2008).

A fase de organogênese (onde ocorre a implantação do blastocisto no útero) na espécie humana vai do 18º ao 57º dia de gestação, e no rato, do 7º ao 14º. Esse período é caracterizado por uma intensa proliferação e migração celular, remodelamento tissular e formação rudimentar das estruturas do corpo (BRENT, 1993). Logo pós a implantação, o blastocisto em ratos e seres humanos rompe o epitélio uterino e invade o estroma endometrial, levando à formação da placenta, caracterizada por uma íntima relação entre as circulações fetal e maternal. Essa implantação é também caracterizada por uma pronunciada reação estroma-

endométrio, referida como decidualização (a decídua forma o componente materno da placenta) (RASWEILER IV; BADWAIK, 1999; WITORSCH, 2002; GRAY et al., 2004).

É o período de maior susceptibilidade, à ação de agentes teratogênicos e embriofetotóxicos, no qual o maior número de malformações pode ser induzido, sendo considerado o período teratogênico clássico (Figura 2) (BRENT, 1993). No final desse período, os principais sistemas já começaram a se desenvolver, entretanto o funcionamento da maioria deles é mínimo, com exceção do sistema cardiovascular. Com a formação dos tecidos e órgãos, a forma do embrião muda, e, no final da oitava semana, o embrião apresenta um aspecto nitidamente humano (MOORE; PERSAUD, 2008).

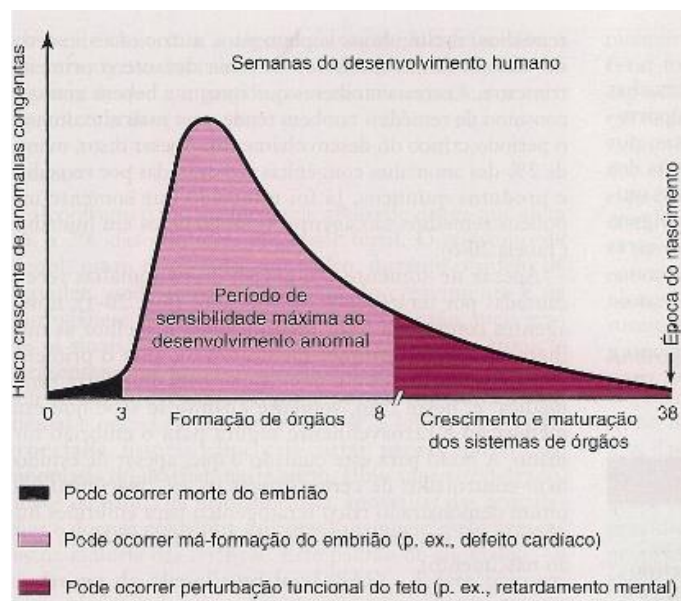


Figura 2 - Ilustração mostrando o risco crescente do desenvolvimento de anomalias congênitas durante a organogênese.

Fonte: MOORE; PERSAUD (2008.).

A terceira fase, conhecida como fase fetal, é caracterizada por diferenciação e crescimento tissular, maturação fisiológica dos diferentes sistemas e crescimento ponderal do feto. Compreende o período que vai do 57º dia pós-fertilização até o nascimento, e do 16º ao 21º em ratos (FRITZ; GIESE, 1990; ROGERS; KALVLOCK, 2001).

Embora a transformação do embrião em feto seja gradual, a mudança de nome é relevante, pois significa que o embrião tornou-se um ser humano reconhecível e que já se formaram todos os sistemas importantes. O desenvolvimento durante o período fetal está basicamente relacionado com o rápido crescimento do corpo e com a diferenciação dos tecidos, órgãos e sistemas. Uma notável mudança que ocorre durante o período fetal é a diminuição relativa do crescimento da cabeça em comparação com o resto do corpo. A taxa

de crescimento durante o período fetal é muito grande, e, durante as últimas semanas, o ganho de peso pelo feto é surpreendente (MOORE; PERSAUD, 2008).

Nesse período, a sensibilidade frente a malformações anatômicas é extremamente baixa, contudo é notório que a exposição a agentes químicos pode produzir morte celular e inibição da divisão celular. Assim, essas alterações podem interferir com a formação dos sistemas nervoso, endócrino e imunológico, promovendo desordens funcionais e de comportamento (FRITZ; GIESE, 1990; ROGERS; KALVLOCK, 2001).

2.4 TOXICOLOGIA REPRODUTIVA

A toxicologia do desenvolvimento estuda os efeitos adversos que ocorrem nos organismos em desenvolvimento após a exposição a substâncias químicas antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou pós-natal até a puberdade. Além de englobar a teratologia e a toxicologia da reprodução (BARROS; SOLANGE, 1996).

A toxicologia reprodutiva é recente e tem suas raízes relacionadas a teratologia. Os estudos voltados para esta área incluem malformações estruturais, retardo no crescimento, dano no desenvolvimento e a morte do organismo, assim como também se preocupa com o estudo da cinética, mecanismo de ação tóxica, patogênese e as consequências da exposição aos agentes tóxicos ou condições que levem ao desenvolvimento anormal do animal (ROGERS; KAVLOCK, 2001).

Assim, para avaliar a toxicidade pré-natal causada por agentes químicos, muitos fatores devem ser considerados, tais como o período da gravidez, a doses administrada, e a diferença de sensibilidade que os mamíferos têm quando expostos a estes agentes. Dessa forma, é muito importante ter em conta tais fatores, podendo-se assim, estabelecer apropriados protocolos experimentais (ALMEIDA; LEMÔNICA, 2000).

Vale ressaltar, que o estudo da toxicidade reprodutiva é dividido em três segmentos que são adaptados de normas da US EPA (*Environmental Protection Agency*), além de serem recomendados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), como descrito abaixo:

- a) Segmento I - Toxicidade Crônica: avalia os efeitos sobre a fertilidade tanto de machos quanto de fêmeas, formação e maturação espermática, acasalamento e fertilização, sendo os machos tratados antes e durante o acasalamento e as fêmeas antes e durante a prenhez e lactação;

- b) Segmento II - Toxicidade Pré-natal (teratogenicidade): avalia as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie expostas durante a fase de organogênese;
- c) Segmento III – Toxicidade Peri e Pós-natal; avalia os efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante a fase de desenvolvimento fetal e lactação.

A legislação recomenda que os testes de toxicidade reprodutiva e teratogenicidade sejam realizados em pelo menos duas espécies animais. Contudo, os ratos são os modelos preferenciais (MELLO; LANGELOH, 2006). Quanto aos ratos, convencionalmente utiliza-se a espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar (COBEA, 1996; HOLLENBACH, 2008).

No que se refere às vias de administração utilizadas nos ensaios de toxicidade reprodutiva, a via oral é a mais utilizada, pois além de permitir determinar a dosagem precisa da substância teste, permite a padronização dos níveis plasmáticos maternos. Entretanto, outras vias de administração podem ser empregadas de acordo com a exposição e características físico-químicas da substância em análise (LEMÔNICA, 2001).

2.5 PLANTAS MEDICINAIS E TOXICOLOGIA REPRODUTIVA

A grande procura por alternativas naturais, para prevenir e curar enfermidades aumentou o consumo de plantas medicinais sob a forma de chás ou outras preparações de plantas e formas farmacêuticas. Com isso, alguns princípios ativos poucos estudados se tornam um perigo real para a saúde da população. Para tanto, os estudos da toxicidade pré-clínica, além da avaliação de segurança e eficácia dos fitoterápicos se torna de extrema importância (HOLLENBACH, 2008).

A utilização de espécies vegetais normalmente são para fins terapêuticos conhecidos a partir de ditos populares e que em alguns casos há comprovação científica. Contudo o que pouco se sabe é que essas mesmas plantas utilizadas para fins terapêuticos podem apresentar efeitos que são desconhecidos e que podem gerar transtornos para gestantes. Assim, o uso dessas plantas pelas gestantes, deve seguir rigorosamente os mesmos cuidados dos medicamentos alopáticos, ou seja, sempre com o conhecimento médico prévio, já que, pôde-se observar em achados literários o fator embriotóxico, teratogênico e abortivo de muitas espécies (RODRIGUES et al., 2011)

Produtos de origem vegetal possuem constituição química complexa, sendo possível que alguns dos seus constituintes não tenham sido identificados ou que ainda não se conheça suas ações sobre o organismo. Isso faz com que seja necessário um maior cuidado na administração destes produtos. Deve-se levar em conta, também, que as plantas medicinais podem interferir na atividade de outros medicamentos sintéticos eventualmente utilizados pela gestante (CLARKE et al., 2007).

Acredita-se que a exposição à planta durante a gravidez seja somente responsável por cerca de 1% das malformações fetais. Embora essa porcentagem pareça pequena, os números totais são expressivos. Dentre as plantas encontradas com esses efeitos comprovados, as partes comumente utilizadas são folhas, frutos, cascas dos galhos, flores e raízes variando de planta para planta e de acordo com sua constituição (RODRIGUES et al., 2011). Os estudos de toxicologia reprodutiva de produtos naturais ainda são incipientes no Brasil, contudo, são necessários, para que a classe médica possa prescrever o uso desses produtos naturais (CALIXTO, 2005).

Almeida e Lemônica (2000), avaliaram em seu estudo os possíveis efeitos tóxicos do extrato hidroalcoólico de *Coleus barbatius* B. durante os períodos de pré-implantação e organogênico em ratas prenhes, nas doses de 220, 440 e 880 mg/kg/dia. Os resultados mostraram que o tratamento com 880 mg/kg/dia do extrato de *C. barbatius* antes da implantação do embrião causou atraso no desenvolvimento fetal e um efeito anti-implantação, o que justifica o uso popular deste extrato com fins abortivos. Após a implantação do embrião retardado no desenvolvimento associado a toxicidade materna foi observado nos fetos do grupo que recebeu 880 mg/kg/dia do extrato.

O estudo realizado por Calliari-Martin et al. (2001), mostrou que a exposição pré-natal à *Artemisia vulgaris* L. em ratas não causou toxicidade materna nem aumentou a frequência de malformações externas em nenhuma das doses administradas (1500, 3000 e 6000 mg/kg). Um aumento na taxa de reabsorções por implantação foi observado com 6000 mg/kg, mostrando que houve perda pós-implantação. Portanto, os dados apresentados neste estudo indicam que a *A. vulgaris* L. na dose de 6000 mg/kg causou um efeito embriotóxico. E em doses abaixo de 6000 mg/kg não foram observados efeitos adversos que pudessem ser a ela associados.

Costa-Silva et al. (2006), investigou os efeitos do óleo extraído das sementes da *Carapa guianensis* (OS) sobre variáveis reprodutivas e, ainda, sobre o desenvolvimento da prole de ratas Wistar nas doses de 0,375, 0,75e 1,5 g/kg, chegando a conclusão de que na prole, não foram registradas alterações, exceto aumento da atividade motora na menor dose do

OS. Concluindo-se que o óleo de *Carapa guianensis* não interfere na fertilidade de ratas Wistar e desenvolvimento da prole, entretanto o aumento da atividade motora pode indicar uma possível ação sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central.

Lima et al. (2011), realizaram um estudo de sobre a performance reprodutiva de ratas prenhas submetidas ao tratamento com um creme vaginal a base do óleo de copaíba. Os resultados deste estudo demonstraram ausência de toxicidade materna e embriofetotoxicidade na dose administrada (2,5% de óleo resina de copaíba), correspondente a 10 vezes a dose que será usada em humanos.

Rocha et al. (2013), avaliaram a toxicidade do extrato de *Pradosia huberi* durante o período de pré-implantação de ratos Wistar nas doses de 1.22, 6.1, e 30.5 mg/kg. Os resultados obtidos revelaram que tal extrato compromete a capacidade reprodutiva durante a fase de pré-implantação embrionária, sugerindo um possível efeito tóxico sobre o sistema reprodutivo de ratos Wistar.

2.6 *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

2.6.1 Posicionamento taxonômico da espécie botânica *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

O posicionamento taxonômico de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. está demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1 - Posicionamento taxonômico de *E. uchi*.

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Magnoliidae
Ordem	Malpighiales
Família	Humiriaceae
Gênero	<i>Endopleura</i>
Espécie	<i>Endopleura uchi</i>

2.6.2 Principais características da espécie botânica *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

A espécie botânica *E. uchi* pertence à família Humiraceae que é constituída por oito (8) gêneros (*Duckesia*, *Endopleura*, *Hylocarpa*, *Humiria*, *Humirastrum*, *Sacoglottis*, *Shistostemon* e *Vantanea*) que incluem cinquenta (50) espécies de plantas que são encontradas principalmente nas regiões neotropicais, apresentando como distribuição geográfica a América do Sul tropical, África tropical, México e Centroamérica (GENTRY, 1993). *E. uchi* é originária da Amazônia brasileira, sendo distribuída por quase toda a Região Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Tocantins) (Figura 3) (MEDEIROS; AMORIM; HOLANDA, 2014).



Figura 3 – Distribuição geográfica de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

Fonte: FLORA DO BRASIL. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23295>>

Apresenta somente *Sacoglottis uchi* (Huber) como sinônimo botânico, classificada pelo botânico Jacques E. Huber. No entanto, José Cuatrecasas, também botânico, observou grandes diferenças entre *uchi* e o gênero *Sacoglottis*, criando dessa forma *E. uchi*. Essa espécie é popularmente conhecida como: uxi, axuá, cumate, uxi-ordinário, uxi-pucu, uxi verdadeiro, uxi-amarelo, uxi-liso, cumatê e pururu. (CUATRECASAS, 1961; PRANCE; SILVA, 1975).

Segundo Shanley e Gaia (1998), *E. uchi* é uma espécie da floresta de terra firme de dossel alto, as árvores atingem cerca de 25 a 30 metros de altura, e um diâmetro de até um metro (Figura 4), possuem cascas com coloração cinza (Figura 5). Essa espécie botânica se reproduz através da semente, levando geralmente de 9 a 10 meses para germinar. As mudas crescem lentamente, e as árvores comumente não frutificam até completar 15 anos.



Figura 4 – *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

Fonte: BRAZILIAN WOODS. Disponível em:

<<http://www.ibama.gov.br/lpf/madeira/caracteristicas.php?ID=92&caracteristica=76>>



Figura 5 – Casca do caule de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

Fonte: BRAZILIAN WOODS. Disponível em:

<<http://www.ibama.gov.br/lpf/madeira/caracteristicas.php?ID=92&caracteristica=76>>

O fruto tem uma dupla camada oblongo-elipsóide de 5 a 7 cm de comprimento, 3 a 4 cm de diâmetro, com peso entre 50 g e 70 g e apresenta coloração verde-amarelada quando

maduro (Figura 6) (SHANLEY et al., 2002). Além do que é apreciado tanto pelas pessoas como pelos animais, por toda a Amazônia brasileira, o que a torna a favorita dos caçadores para construir armadilhas de caça, sendo dessa forma, de grande importância na alimentação dos animais silvestres (SHANLEY; GAIA, 1998).



Figura 6 - Frutos de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.
Fonte: MAX et al. (2002).

2.6.3 Importância da espécie botânica *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

O fruto de *E. uchi* era chamado de “fruta do pobre” devido ao seu baixo custo, sendo assim, acessível às pessoas de baixa renda. Contudo, hoje é mais valorizado, atingindo bons preços no mercado, além de ser comido cru, ou na forma de refresco é também consumido como sorvete ou picolé. O óleo que é produzido é de boa qualidade e utilizado na comida e como remédio no tratamento de sinusites em crianças e para prisão de ventre nos adultos. Além de que das sementes fazem-se artesanato, defumação e amuleto (SHANLEY; MEDINA, 2004; SHANLEY; GAIA, 1998). Uxi oferece atualmente um retorno rentável para muitos colheitadeiras. Em muitas comunidades que cercam Belém, a estação de frutificação de 4 meses gera a maior parte da renda em dinheiro doméstico (SHANLEY et al., 2002).

Os estudos com polpa de frutos de *E. uchi* o indicaram como fonte de ácidos graxos, fibras, esteróides, sais minerais, vitaminas C e E Sendo que os principais ácidos graxos identificados foram o ácido oléico (7,38%) e ácido palmítico (3,78%). Vale ressaltar, que a composição do aroma presente nos frutos também foi avaliada, sendo identificados 42 componentes, com predominância de 3,3-dimetil-2-butanol (18,8%) e eugenol (14,0%) (MARX et al., 2002).

Costa et al. (2010), coletaram frutas e castanhas das regiões Norte e Nordeste do Brasil para determinar o seu conteúdo de fitoesterol e tocoferol. As espécies botânicas estudadas foram *Aptandra spruceana* M., *Bertholletia excelsa* H.B.K, *Couma rigida* M, *Euterpe oleracea* M, *Maximiliana maripa* D, *Genipa Americana* L, *Mauritia flexuosa* L. e *Endopleura uchi* C. Para os autores, as polpas de maracujá (*Couma rigida* M), inajá (*Maximiliana maripa* D) e jenipapo (*Genipa Americana* L) apresentaram os maiores teores de fitoesteróis totais. No entanto, considerando o α -tocoferol equivalentes, as polpas de Buriti (*Mauritia flexuosa* L) ($346.721 \mu\text{g g}^{-1}$) e uxi (*Endopleura uchi* C.) ($200.92 \mu\text{g g}^{-1}$) continham a maior atividade de vitamina E. Sendo que dessa forma, sugeriram que tais frutos e nozes são eficazes para ser cultivado e comercializado como recursos alimentares alternativos para estes compostos bioativos.

Corroborando com o estudo de Magalhães et al. (2007) que também inferiu que o fruto de *E. uchi* apresenta potencial como alimento funcional, devido a importância do papel nutricional dos carotenoides, pois em seu estudo evidenciou através da análise da composição do mesmo, a predominância de β -caroteno ($16,57 \mu\text{g.g}^{-1}$) e isômeros do β -caroteno, *trans*- β -caroteno (89,3%), *13-cis*- β -caroteno (8%) e *9-cis*- β -caroteno (3%), além do isolamento do glicosídeo bergenina, composto que apresenta bioatividade.

Neves et al. (2012), caracterizaram a atividade antioxidante de oito espécies de frutos nativos da região amazônica brasileira, observando que quando a relação entre a atividade antioxidante medida pelo método ORAC e o conteúdo de fenólicos totais foram analisados, o uxi evidenciou o poder antioxidante mais elevado quando comparado aos demais frutos estudados (Açaí, Araça-boi, Cajá, Caju, Camu-camu, Inajá e Murici), apesar de apresentar níveis relativamente baixos no conteúdo de fenólicos totais e na atividade antioxidante medida pelo método ORAC. Dessa forma, segundo os autores, isso significa que existe uma contribuição considerável desses compostos fenólicos na atividade antioxidante do fruto de *E. uchi*.

Além do valor econômico da fruta, as cascas do caule de *E. uchi* ganharam destaque através de declarações feitas em televisão sobre a eficácia que tal espécie apresentava para o tratamento de artrite, reumatismo, colesterol e diabetes (SHANLEY; GAIA, 1998). O chá de sua casca também é usado na medicina tradicional como um anti-inflamatório e contra tumores e infecções uterinas (CORRÊA, 1984; REVILLA, 2001). A mesma é bastante apreciada para a carpintaria por apresentarem madeira densa. Sendo que na Amazônia oriental, ela é bastante extraída pela indústria madeireira. Considerada uma espécie vegetal

local bastante valiosa que geram conflitos de uso devido a excelente madeira, altos valores frutíferos, medicinal, além de servir como um atrativo para a caça (SHANLEY; GAIA, 1998).

2.6.4 Constituintes químicos e atividades biológicas da espécie botânica *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

Segundo Politi (2009), as cascas de *E. uchi* é constituída principalmente por três tipos de metabólitos secundários: taninos, cumarinas e saponinas. Contudo, outro estudo fitoquímico realizado a partir do extrato bruto etanólico das cascas, levou ao isolamento de isocumarinas bergenina e 8,10 dimetoxibergenina (Figura 7 - A e B, respectivamente), além dos triterpenóides pentacíclicos, ácido masílinico e o seu éster masilinato de metila (LUNA et al., 2000).

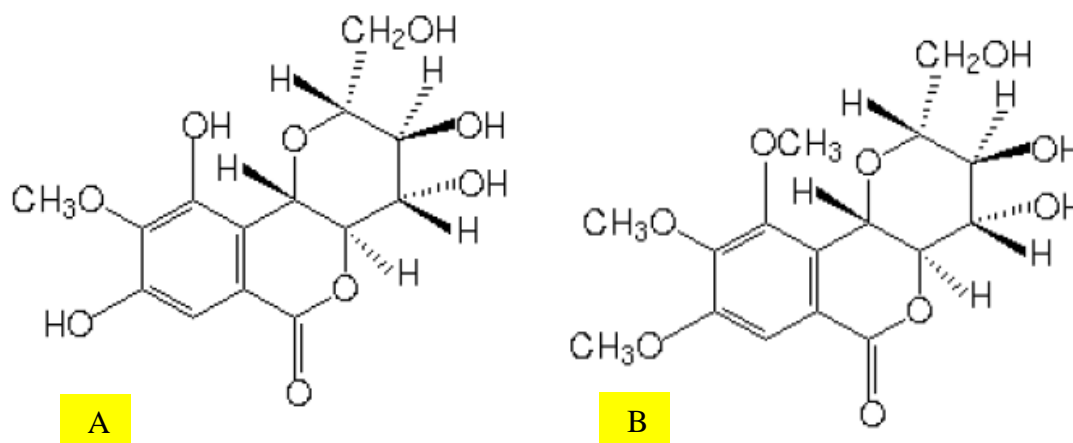


Figura 7 - Estruturas químicas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. A) Bergenina; B) 8,10 Dimetoxibergenina.

Fonte: BORGES (2010).

Politi et al. (2011), ao testarem a atividade antioxidante, citotoxicidade e atividade antimicrobiana de cinco diferentes extratos preparados da casca de *E. uchi*, selecionados por seu teor de taninos totais, chegaram a conclusão de que na atividade antioxidante, os valores encontrados foram muito semelhantes entre os extratos e os padrões antioxidantes utilizados nos ensaios. Já a análise de citotoxicidade em células de mamíferos indicaram que todos os extratos testados exibiram IC_{50} com valores maiores do que a maior concentração utilizada, mostrando que eles não apresentam um risco quando consumidos sob essas condições. Quanto à atividade antimicrobiana o extrato foi testado contra cinco cepas bacterianas e uma cepa de

levedura. Contudo, nenhum dos extratos analisados apresentou efetividade na inibição do crescimento para a os diversos microrganismos testados.

Tacon (2013), realizou um trabalho, cujo objetivo foi estudar a extração das cascas de *Endopleura uchi*, usando o método de maceração dinâmica, analisando o tempo e a temperatura de extração e a porcentagem de material vegetal utilizada em relação ao solvente. Entretanto, um projeto Box-Behnken foi aplicado para estudar a influência desses fatores e as respectivas superfícies de resposta. A caracterização do extrato foi feita por determinação de sua atividade antioxidante por DPPH; conteúdo de polifenóis total e conteúdo de bergenina. Em geral, os extratos mostraram boa atividade antioxidante, com a IC_{50} variando 4,02 - 5,87 $\mu\text{g/mL}$. O teor de polifenóis variaram de 31,89 para 47,82%. Além de que altos níveis de marcadores químicos foram observados em todos os extratos, com teor de 35,58% de bergenina. Para os autores, os resultados mostram que o estudo multivariado de extração é um passo fundamental para o desenvolvimento e padronização de extratos de *E. uchi*.

No estudo de Bento et al. (2014), um polissacarídeo (AGb) obtido a partir das cascas de *E. uchi* (decoção) foi purificado, adquirindo-se uma arabinogalactana tipo II (AG), sendo que esta foi avaliada pelos seus efeitos citotóxicos em células HeLa. A arabinogalactana tipo II (5-500 $\mu\text{g/ml}$) reduziu a viabilidade celular as 48 e 72 h (aproximadamente 20%), mas não de uma forma dependente da dose. Observaram também que a proliferação celular foi reduzida por AG, com uma inibição de 25% (100 $\mu\text{g/ml}$) às 72 h. Assim, concluíram que a citotoxicidade exibido por AG não envolve vias relacionadas com o ciclo celular.

Vale ressaltar que a bergenina extraída tanto do fruto como das cascas de *E. uchi* têm sido apontada como principal constituinte responsável pelas diversas atividades biológicas demonstrada na literatura.

Nunomura et al. (2009), isolaram a bergenina pura do extrato metanólico das cascas de *E. uchi* e depois determinaram a atividade anti-inflamatória in vitro pela medida da concentração inibitória (CI) da bergenina frente a três importantes enzimas: COX-1, COX-2 (ciclooxigenases) e fosfolipase A_2 (PLA₂). Sendo que essas enzimas são importantes alvos terapêuticos no processo de descobrimento de novas drogas anti-inflamatórias associadas com a biossíntese das prostaglandinas. A bergenina foi capaz de inibir seletivamente COX-2 ($CI_{50} = 1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$), demonstrando sua importância como provável responsável pela atividade anti-inflamatória dos chás das cascas de *E. uchi*, uma vez que inibidores seletivos de COX-2 têm sido clinicamente validados como drogas anti-inflamatórias por sua eficácia e por não apresentar efeitos gastrointestinais colaterais. Os autores também avaliaram a quantidade de bergenina no extrato aquoso preparado da forma popular, através do CLAE em fase reversa,

obtendo um resultado como sendo 3% nas cascas, indicando uma alta concentração de bergenina nos chás e nas cascas de *E. uchi*.

Silva et al. (2009), também isolaram o constituinte bergenina através das cascas de *E. uchi*, por meio de cromatografia em coluna e posterior identificação estrutural através de espectros de RMN. Quanto a avaliação da atividade antimicrobiana da bergenina, dos extratos e frações de *E. uchi*, esta foi realizada frente a vários microorganismos isolados clinicamente, sendo que os resultados revelaram a bergenina como um inibidor seletivo de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*. Nesse contexto, para os autores a atividade seletiva de bergenina contra três espécies de *Candida* auxilia na compreensão do seu uso tradicional contra que infecções que afetam o aparelho reprodutor feminino.

Outras atividades biológicas também são atribuídas a esse glicosídeo, tal como atividade anti-hepatotóxica (KIM et al., 2000) e neuroprotetora (TAKAHASHI et al., 2003). Entretanto, Borges et al. (2011) visando a obtenção de um derivado mais potente que a bergenina decidiu acetilar esta substância. Bergenina foi isolada a partir do fracionamento por cromatografia por via úmida do extrato aquoso das cascas do caule de *E. uchi* e acetilbergenina (Figura 8) a partir da acetilação da bergenina. A acetilbergenina foi testada em modelos de nocicepção, sendo que os testes realizados foram de contorção abdominal, placa quente e formalina. No teste de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%, foi verificado que a acetilbergenina, nas doses de 1, 5, 10, 15 e 25 mg/kg, bloqueou o número de contorções abdominais em 28,2%, 52,7%, 61,1%, 68,3% e 95,0%, respectivamente, e de maneira dose-dependente quando comparada ao grupo controle. DE50 calculada foi de 6,8 mg/kg. No teste da placa quente, acetilbergenina (6,8 mg/kg) não induziu alterações no tempo de latência quando comparada ao grupo controle. No teste da formalina, acetilbergenina (6,8 mg/kg) inibiu em 88,3% o estímulo algíco na 2ª fase (inflamatória) quando comparada ao grupo controle. Os resultados sugerem que acetilbergenina apresenta atividade antinociceptiva, provavelmente, de origem periférica.

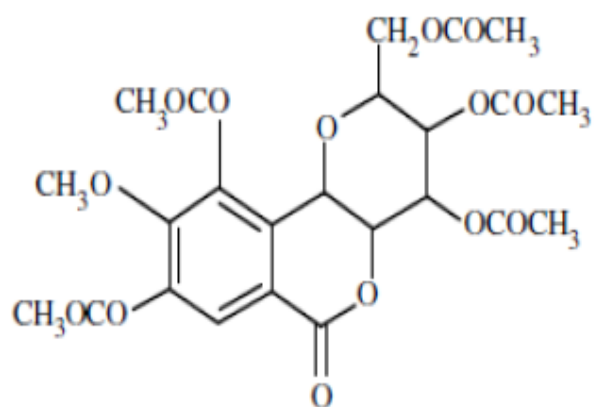


Figura 8 - Acetilbergenina
Fonte: BORGES (2010).

REFERÊNCIAS

- ALBAGLI, S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. **Parcerias Estratégicas**, v. 6, p. 5-19, 2001.
- ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 73, p. 53-60, 2000.
- BARROS, S. B. M.; SOLANGE, C. D. Avaliação da toxicidade. In: SEIZE, O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu editora LTDA, 1996. p.59-70.
- BENTO, J. F.; NOLETO, G. R.; Petkowicz, C. L. O. Isolation of an arabinogalactan from *Endopleura uchi* bark decoction and its effect on HeLa cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p.871-877, 2014.
- BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 566-574.
- BORGES, J. C. M.; FILHO, H. S. R.; GUILHON, G. M. S. P.; CARVALHO, J. C. T.; SOUSA, P. G. C. Antinociceptive activity of acetylbergenin in mice. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p. 1303-8, 2011.
- BORGES, J. C. M. **Acetilbergenina: obtenção e avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória**. 2010. 122 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.
- BRENT, R. L. What is the relationship between birth defects and pregnancy bleeding? New perspectives provided by the NICHD workshop dealing with the association of chorionic villous sampling and the occurrence of limb reduction defects. **Teratol**, v. 48, p. 93-95, 1993.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.
- CALLIARI-MARTIM, M. R.; DIETERICH, S.; BORTOLINI, C. E.; CUNHA, C. T.; LORENCETI, G. Embriotoxicidade da *Artemisia Vulgaris* LINNÉ em ratas. **Revista Médica HSVP**, v. 11, p. 12-17, 2001.
- CARVALHO, J.C.T. Considerações gerais sobre fitoterápicos. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004. p 43-47.
- CARVALHO, J. C. T. **Validação Química-Farmacológica da Espécie Vegetal *Pterodon emarginatus***. 1998, 184 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), São Paulo, 1998.
- CÁUPER, G. C. B. **Biodiversidade da Amazônia**. Centro Cultural dos Povos da Amazônia. 2006, 163 p. Disponível em: www.povosamazonia.am.gov.br/pdf/bio_vol1.pdf. Acesso em: 15 Maio12.

CAVALCANTI, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Museu Paraense Emílio Goeldi, edições CEJUP, CNPq, Belém, 1991. 279 p.

CAVALHEIRO, A. J.; DURIGAN, A. G. Aplicações: sustentabilidade, prospecção. **Revista Biota Neotropica**: São Carlos, 2002.

CLARKE, J. H. R.; RATES, S.M.K.; BRIDI, R. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Infarma**, v.19, p.41-8, 2007.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para Técnico em Bioterismo**. 2. ed. São Paulo: H. A. Rothchild, 1996, 259 p.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, Brasil, vol. 6, 1984. 326 p.

COSTA, P. A.; BALLUS, C.A.; TEXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, p. 1603-1606, 2010.

COSTA-SILVA, J.H; LYRA, M.M.A.; LIMA, C.R.; ARRUDA, V.M.; ARAÚJO, A.V.; RIBEIRO, A.R.; ARRUDA, A.C.; FRAGA, M.C.C.A.; LAFAYETTE, S.S.L.; WANDERLEY, A. G. Estudo Toxicológico Reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em Ratas Wistar. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, p. 425 – 428, 2006.

CUATRECASAS, J. A. A taxonomic revision of Humiriaceae, contributions from the United States National Herbarium. **Bull United States National Museum**, v.35, part 2, 1961.

FAVEIRO, A. M. **Efeitos da exposição materna ou paterna ao disseleneto de difenila sobre o desenvolvimento intra-uterino da prole de ratas wistar**. 2006. 79 f. Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Tpxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FRITZ, H.; GIESE, K. Evaluation of the Teratogenic Potential of Chemicals in the Rat. **Pharmacol**, v. 40, p. 1 - 28, 1990.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, p. 495-500, 1995.

GENTRY, A. H. **Woody plants of northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru) with supplementary notes on herbaceous taxa**. Published in Associatio with Conservation International, 1993. 466 p.

GRAY. L. E. e col. Use of the Laboratory Rat as a Model in Endócrine Disruptor Screening and Testing. **ILAR Journal**, v. 45, p. 425-437, 2004.

HANSEN, W.F.; YANKIWITZ, J. Pharmacologic therapy for medical discords during pregnancy. **Clinical obstetrics and Gynecology**, v.45, p. 136-152, 2002.

HOLLENBACH, C. B. **Estudo da Toxicidade reprodutiva de duas formulações fitoterápicas comerciais contendo soja [*Glycine max* (L.) Merr] em ratos Wistar**. 2008.

132 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

JELÍNEK, R. The contribution of new findings and ideas to the old principles of teratology. **Reproductive Toxicology**, v. 20, p. 295-300, 2005.

KALTER, H. Teratology in the 20th century. Environment causes of congenital malformations in humans and how they were established. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, p. 131-282, 2003.

KIM, H. S.; LIM, H. K.; CHUNG, M. W.; KIM, Y. C. Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 79-83, 2000.

LEMÔNICA, I. P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M. T. V.; SCHÜLER-FACCINI. **Manual de teratogênese**. Porto Alegre: Ed da Universidade/UFRGS, 2001, p. 19-39.

LIMA, C. S.; MEDEIROS, B. J. L.; FAVACHO, H. A. S.; SANTOS, K. C.; OLIVEIRA, B. R.; TAGLIALEGNA, J. C.; COSTA, E. V. M.; CAMPOS, K. J.; CARVALHO, J. C. T. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). **Phytomedicine**, v. 18, p. 1013-1023, 2011.

LUNA, J. S.; SILVA, T. M.; BENTO, E. S.; SANT'ANA, A. E. G. Isolamento e Identificação estrutural dos constituintes químicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000, Poços de Caldas-MG: **Livro de Resumos**, v.2, 2000.

MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. P.; MARINHO, H. A.; FERREIRA, A. G. Identificação de bergenina e carotenoides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiraceae). **Acta Amazonica**, v. 37, p. 447- 450, 2007.

MARX, F., ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. Studies of edible Amazonian plants. Part 5: Chemical characterization of Amazonian *Endopleura uchi* fruits. **European Food Research and Technology** v.214, p.331-334, 2002.

MEDEIROS, H.; AMORIM, A. M. A.; HOLANDA, A. S. S. Humiriaceae in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23295>>. Acesso em: 09 Jul. 2014

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 536 p.

NEVES, L. C.; CAMPOS, A. J.; BENEDETTE, R. M.; TOSIN, J. M.; CHAGAS, E. A. Characterization of the antioxidant capacity of natives fruits from the brazilian amazon region. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, p. 1165-1173, 2012.

NOGUEIRA, K. C.; LIBERMAN, B. Neuroendocrinologia da gravidez: A Grávida e o Feto. In: CUKIERT, A.; LIBERMAN, B. **Neuroendocrinologia Clínica e Cirúrgica**, 1 ed. São Paulo: Lemos, 2002. p 149-157.

NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; DA SILVA, S. L.; NUNOMURA, S. M. Characterization of bergerin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1060-1064, 2009.

ODALIA-RÍMOLI, A. et al. Biodiversidade, biotecnologia e conservação genética em desenvolvimento local. **Revista Internacional de Desenvolvimento**, v. 1, p. 21- 30, 2000.

OPITZ, J. M. **Tópicos recentes em genética clínica**. Ribeirão Preto: Ed. Sociedade Brasileira de Genética, 1982.

POLITI, F. A. S.; MELLO, J. C. P.; MIGLIATO, K. F.; NEPOMUCENO, A. L. A.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p. 2757-2768, 2011.

POLITI, F. A. S. **Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae)**. 2009. 144 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.

PRANCE, G.; SILVA, M. **Árvores de Manaus**. 17^aed. Manaus. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), 1975. p. 115-118.

RASWEILER IV, J. J.; BADWAIK, N. K. Discoidal Placenta. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **Encyclopedia of Reproduction**, San Diego: Academic Press, v. 1, p. 890-902, 1999.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 2001. 405p.

RIBEIRO, L.; LERDA, D. Conhecendo a biodiversidade. **Revista Biô**. 2007, v. 1, 36p. 2007. Disponível em: <http://www.conservation.org.br/publicacoes/files/revista_Bio.pdf> Acesso em: 18 Dec. 2012.

ROCHA, A. O. B.; SOUSA, L. Q.; MOTA, C. A. X.; SANTOS, E. C. S.; DINIZ, M. F. F. M.; SILVA, M. S.; PIMENTA, M. B. F.; SÁ, R.C.S. Evaluation of the Toxicity of *Pradosia huberi* Extract during the Preimplantation in Wistar Rats. **BioMed Research International**. v. 2013, p.1-6, 2013.

RODRIGUES, H.G.; MEIRELES, C.G.; LIMA, J.T.S.; TOLEDO, G.P.; CARDOSO, J.L.; GOMES, S.L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, p. 359-366, 2011.

ROGERS, J. M.; KALVLOCK, R. J. Developmental toxicology. In: KLAASEN, C. D. (Ed.) **Cassarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons**. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 107-132.

SCHARDEIN, J.L. Principles of teratogenesis applicable to drug and chemical exposure. **Marcel Dekker Inc**, New York, p.1-67, 2000.

SCHUMACHER, G-H. Teratology in cultural documents and today. **Annals of Anatomy**, 186, p. 539-546, 2004.

SHANLEY, P.; GAIA, G. A “fruta do pobre” se torna lucrativa: a *Endopleura uchi* Cuatrec. em áreas manejadas próximo a Belém, Brasil, 1998, cap.11, p. 219-240. In: Alexiades, M.N. y Shanley, P. (eds.) 2004 Productos forestales, medios de subsistencia y conservación: Estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables. Volumen 3 - América Latina. Centro para La Investigación Forestal Internacional (CIFOR), Bogor, Indonesia, 499 p.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Editora Supercorres. CIFOR /IMAZON, Belém, 2004.

SHANLEY, P.; LUZ, L.; SWINGLAND, I. R. The faint promise of a distant market: a survey of Belém’s trade in non-timber forest products. **Biodiversity and Conservation**, v.11, p.615-636, 2002.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Plantas Mediciniais. In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004. p 38-39.

SILVA, S. L. da; OLIVEIRA, V. G.; YANO, T.; NUNOMURA, R. C. S. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta amazônica**, v. 39, p. 187-191, 2009.

SMITHELLS, R. W.; NEWMAN, C. G. H. Recognition of thalidomide defects. **Journal of Medical Genetics**, v. 29, p. 716-723, 1992.

TACON, L. A.; FREITAS, L. A. Box-Behnken design to study the bergenin content and antioxidant activity of *Endopleura uchi* bark extracts obtained by dynamic maceration. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 65-71, 2013.

TAKAHASHI, H.; KOSAKA, M.; WATANABE, Y.; NAKADE, K.; FUKUYAMA, Y. Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1781-8, 2003.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289-306, 2006.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, 519-528, 2005.

WITORSCH, R. J. Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 905-912, 2002.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar em nível não clínico, a toxicidade subcrônica e reprodutiva (períodos de pré-implantação, organogênese e fetal), em *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, resultantes da administração oral do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. Uchi*.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar os efeitos da administração subcrônica do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. uchi* sobre os parâmetros de desenvolvimento ponderal, ingestão de água, ingestão de ração, hematológicos e bioquímicos de *R. norvegicus* (machos e fêmeas).
- ✓ Investigar os efeitos da administração oral do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. uchi* sobre a prenhez no período pré-implantação;
- ✓ Investigar os efeitos da administração oral do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. uchi* no período de organogênese;
- ✓ Investigar os efeitos da administração oral do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. uchi* no período de desenvolvimento fetal;
- ✓ Analisar variáveis que indiquem toxicidade nas progenitoras;
- ✓ Avaliar a performance reprodutiva materna;
- ✓ Analisar variáveis que indiquem embriofetotoxicidade;
- ✓ Avaliar variáveis que indiquem teratogenicidade (anomalias e/ou malformações externas e internas);
- ✓ Avaliar o desenvolvimento geral e sexual da progênie de ratas expostas ao extrato hidroetanólico *E. uchi* no período de desenvolvimento fetal.

**CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA TOXIDADE SUBCRÔNICA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, EM RATOS WISTAR.**

RESUMO

Endopleura uchi (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae), é uma espécie da floresta Amazônica brasileira, usada popularmente contra distúrbios menstruais e inflamações uterinas. O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade subcrônica do extrato hidroetanólico de *E. uchi*, sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos Wistar. Ratos foram tratados durante 22 dias consecutivos com o EHEEu (via oral) com a dose de 500 mg/kg e posteriormente, determinados os perfis bioquímico e hematológico. Os resultados mostram que pelo tratamento realizado não produziu sinais de toxicidade ou morte, nem alteração no desenvolvimento ponderal, ingestão de água e ração desses animais. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos não foram modificados pela administração EHEEu, com exceção do índice hematimétrico MCHC dos ratos (machos) do grupo tratado, contudo, não foi atribuído relevância clínica, pois o mesmo se manteve dentro dos valores de referência para a espécie. Sendo assim, a administração subcrônica do EHEEu não produziu efeito tóxico em ratos Wistar.

Palavras-chave: *Endopleura uchi*. Tratamento Subcrônico. Hematologia. Bioquímica.

ABSTRACT

Endopleura uchi (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) is a species from Brazilian Amazon rainforest, popularly used against menstrual disorders and uterine inflammation. This study aimed to evaluate the subchronic toxicity of hydroethanolic extract from *E. uchi* (EHEEu) in Wistar rats based on biochemical and hematological parameters. Rats were treated with daily doses of EHEEu (500 mg/kg - gavage), and then hematological and biochemical parameters were observed. The results shows that the treatment performed produced no signs of toxicity or death, as well as no changes in weight gain or daily intake of water and food. Biochemical and hematological parameters were not modified by EHEEu administration, with the exception of erythrocyte index of rats (males) in the treated group, however, it was not assigned clinical relevance once it remained within the reference range for the species. Thus, subchronic administration of EHEEu produced no toxic effects in Wistar rats.

Keywords: *Endopleura uchi*. Subchronic Treatment. Hematology. Biochemistry.

1 INTRODUÇÃO

O uso tradicional de diversas plantas medicinais baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança (TUROLLA ; NASCIMENTO, 2006). Porém, ao longo do tempo percebeu-se que determinadas plantas apresentavam substâncias potencialmente perigosas e, por esta razão, deveriam ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2005).

Endopleura uchi (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) é uma espécie botânica típica da floresta Amazônica brasileira. Essa planta é encontrada em mata de terra firme, no qual é amplamente espalhada pela Bacia Amazônica. É conhecida popularmente na região como uchi, uxi, axuá, uchi-pucu, uxi-amarelo, uxi-liso e uxi-ordinário (CUATRECASAS, 1961; SCHULTES, 1979). As cascas do caule de *E. Uchi* são utilizadas na forma de chá, para tratar distúrbios menstruais e inflamações uterinas (REVILLA, 2001). Outras indicações também são conhecidas e citadas, como atividade antimicrobiana (POLITI, 2009), atividade antioxidante elevada e ausência de citotoxicidade (POLITI, 2011). Esses resultados justificam cada vez mais o crescente interesse pelo estudo dessa planta.

Segundo Politi (2009) as cascas de *E. uchi* são constituídas principalmente por três tipos de metabólitos secundários: taninos, cumarinas e saponinas. Outro estudo fitoquímico realizado a partir do extrato bruto etanólico das cascas, levou ao isolamento de isocumarinas bergenina e 8,10 dimetoxibergenina, triterpenóides pentacíclicos, ácido masílinico e o seu éster masilinato de metila (LUNA et al., 2000). A bergenina extraída da casca de *E. uchi* têm sido apontada como o principal responsável pelas atividades biológicas, tais como anti-inflamatória (NUNOMURA et al., 2009), antimicrobiana (SILVA et al., 2009), neuroprotetora (TAKAHASHI et al., 2003) e antinociceptiva (OLIVEIRA, et al., 2011).

Até o momento os estudos toxicológicos realizados não sustentam a segurança do uso de *E. uchi*. No entanto, Politi et al. (2010) avaliaram a toxicidade oral aguda em camundongos machos, com o extrato de cascas pulverizadas de *E. uchi*. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxidade subcrônica do extrato hidroetanólico bruto das cascas do caule de *E. uchi*, em ratos Wistar, de ambos os sexos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As execuções dos diversos protocolos experimentais foram realizadas no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal Viçosa – UFV, situado na Avenida Peter Henry Rolfs, s/n – Campus Universitário – Viçosa, MG - Brasil.

2.1 MATERIAL BOTÂNICO

O pó das cascas do caule de *E. uchi* (464g) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da UFPA, sendo que este material botânico foi coletado na região metropolitana de Belém, Estado do Pará, Brasil em 03 de abril de 2005, em mata de terra firme e a identificação efetuada por botânicos da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), cuja exsicata encontra-se depositada no herbário da referida instituição sob código nº 180611.

2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

As cascas do caule de *E. uchi* foram dessecadas em estufa de ar circulante a 40°C, por 72 h e após sua secagem, trituradas em moinho de facas, obtendo-se o pó da planta (464g). Posteriormente, este material foi macerado em solução hidroalcoólica a 75%, na proporção de 1:5 em temperatura ambiente, durante 7 dias, sob agitação constante (BARBOSA; TAVARES, 2001). Em seguida, o macerado foi filtrado e concentrado em rotaevaporador (QUIMIS, Modelo Q. 218.2), na temperatura de 40°C, até a evaporação completa do solvente. O filtrado concentrado foi submetido à liofilização fornecendo 10.65% de rendimento.

2.3 ANÁLISE DO TEOR DE POLIFENÓIS E TANINOS TOTAIS

Adaptou-se o método da Farmacopéia brasileira 5ª edição (2010) descrito para a espécie *Ratânia* (*Ratanhiae radix*) e submetida à curva de regressão linear preparada com o ácido pirogálico, sendo que todas as análises foram realizados em triplicata.

Para a análise de polifenóis totais foram transferidos 5 mL da solução estoque para balão volumétrico de 50 mL e misturada com 2 mL do reagente Ácido fosfomolibdotúngstico modificado e completado o volume com solução carbonato de sódio a 15%. Posteriormente as

absorvâncias foram medidas em 760 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, modelo UVmini-1240).

Para polifenóis não complexados com proteínas, utilizou-se albumina bovina desidratada, depois de filtrada, foram transferidos 5 mL dessa solução e repetido o mesmo processo para polifenóis, todas as absorvâncias foram medidas 2 minutos após a adição do último reagente, utilizado como branco a solução de carbonato a 15%.

Os teores de polifenóis foram calculados a partir da equação da reta obtida pela curva padrão do ácido pirogálico em concentrações de 0,01 a 0,05 mg/mL submetidas a reação com o ácido fosfomolibdotúngstico em meio alcalino. A concentração de polifenóis foi obtida em porcentagem aplicando-se a seguinte fórmula descrita por Sousa (2009):

$$\%Pf = \frac{X \left(\frac{mg}{mL} \right) \cdot FD \cdot 100}{m (mg)}$$

Onde: %Pf= porcentagem de polifenóis; X= concentração da amostra obtida na equação da reta; FD= fator de diluição da solução; m= massa da amostra.

2.4 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem wistar (machos e fêmeas), com peso em torno de 170g a 215g provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG. Estes passaram por um período de adaptação no Laboratório de Biofármacos da Universidade Federal de Viçosa - MG, mantidos sob condições controladas de iluminação, ciclo 12 horas claro/escuro (período claro das 7:00 h da manhã as 19:00 h da noite), temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e receberam água e ração (Labina®) à vontade.

O projeto de dissertação foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá, com o registro CEP – UNIFAP 001A/2012.

2.4.1 Tratamento dos animais e avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

Vinte ratos correspondendo a dois grupos n=10/grupo (5 machos e 5 fêmeas), foram distribuídos aleatoriamente em subgrupos de cinco e tratados durante 22 dias consecutivos, por via oral, com EHEEu na dose de 500 mg/kg (grupo tratado) e água destilada (grupo

controle). Os parâmetros indicativos de toxicidade e as análises hemato-bioquímicas foram realizadas segundo o método descrito por Silva et al. (2005), com algumas adaptações. Foram determinado os parâmetros como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, colesterol HDL, triglicérides, fosfatase alcalina (FA), albumina, glicose, creatinina, hemograma total e diferencial, usando os equipamentos de determinação bioquímica multiparamétrico (Alizé) da Biomérieux e analisador automático de células hematológicas HumaCount Plus.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas diversas análises foram expressos em média \pm erro padrão da média (média \pm E.P.M.) de cada grupo experimental. Para a análise bioquímica e hematológica, foi utilizado o teste de Mann - Whitney, e, para comparar os dados do desenvolvimento ponderal, ingestão de água e ração foi utilizado o teste “t” de Student (não pareado). Os gráficos foram construídos através do software GraphPad Prism[®] (versão 5.03). Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os polifenóis variam desde moléculas simples até moléculas complexas com alto grau de polimerização e classificam-se em diversas classes de metabólitos secundários, como flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas, tocoferóis e dentre outros e são facilmente oxidáveis por metais, luz, calor e em processos enzimáticos. (SHAHIDI, 1995; SIMÕES et al., 2004).

Com o extrato liofilizado, o teor de polifenóis totais capazes de reduzir o ácido fosfomolibdotúngstico em 2 minutos exatos de leitura em espectrofotometro e submetido a curva de regressão linear (Figura 1), foi igual a 7,01 % equivalendo a média de $0,021 \pm 0,008$ mg/mL (n=3). A análise de taninos totais demonstrou um percentual de 1,5 % com $0,0045 \pm 0,0011$ mg/mL (n=3) representando 21,4 % de todos os polifenóis no extrato. Possivelmente o baixo teor de taninos é decorrente por esta espécie ser encontra na floresta amazônica, onde há grande incidência de regiões sombreadas e a luminosidade é um fator que afeta a produção de taninos, sendo diminuída em ambientes sombreados comparados a espécies cultivadas ao sol e quanto mais velha a planta, maior a concentração de taninos (SCHEFFER, 2002).

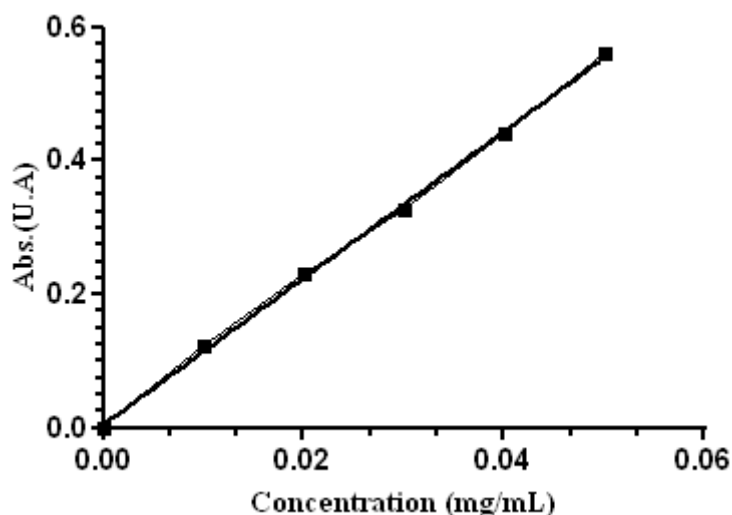


Figura 1 - Curva padrão do ácido pirogálico por espectrofotometria ($\lambda=760$ nm), concentrações de 0,01 a 0,05 mg/mL submetidas a reação com o ácido fosfomolibdotúngstico em meio alcalino com leitura após 2 minutos de reação. A regressão linear dos resultados obteve coeficiente de correlação $r^2=0.9987$ com a equação da reta $y= 10.450x- 0.0118$.

Um dos indicadores de efeitos adversos de drogas e substâncias químicas é a alteração na massa corporal dos animais (TOFOVIC E JACKSON, 1999; RAZA et al., 2002; TEO et

al., 2002). A toxicidade sistêmica, também, pode ser diagnosticada pela diminuição da ingestão de água, ração, alterações comportamentais como prostração e apatia, e pelo aparecimento de pêlos arrepiados (MELO, 2001).

Nesse estudo, foi observado que o ganho de massa corporal dos grupos de ratos (machos) controle e tratado com EHEEu foi maior que os grupos de ratos (fêmeas) controle e tratado com EHEEu. Contudo, verificou-se que a administração oral por 22 dias com o EHEEu na dose de 500 mg/kg, em ratos Wistar, machos e fêmeas, não alterou o desenvolvimento ponderal e a ingestão diária de água e ração desses animais, pois não foram observadas alterações significativas em relação ao grupo controle (Figuras 2, 3 e 4).

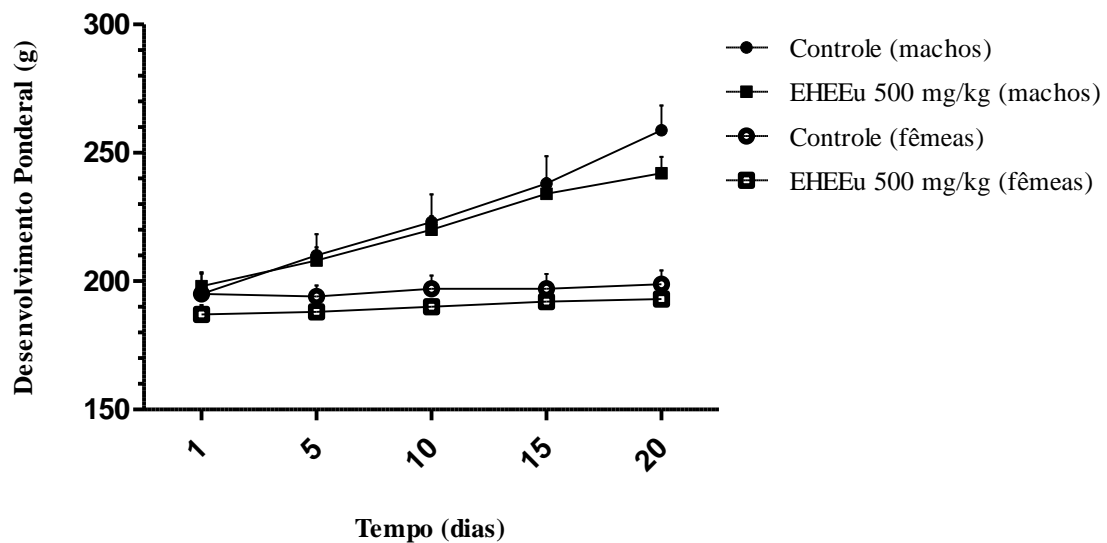


Figura 2 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratos (machos e fêmeas), linhagem Wistar, por 22 dias consecutivos. No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

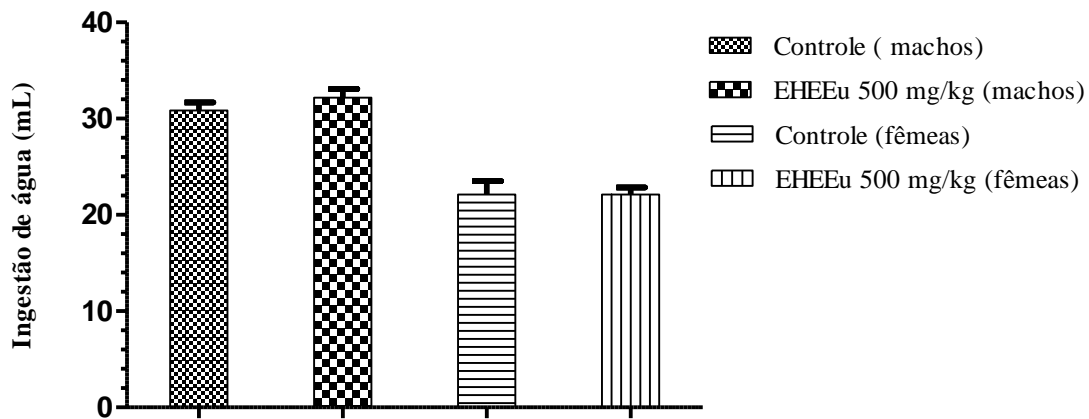


Figura 3 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o consumo diário de água (mL) de ratos (machos e fêmeas), linhagem Wistar, por 22 dias consecutivos. No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

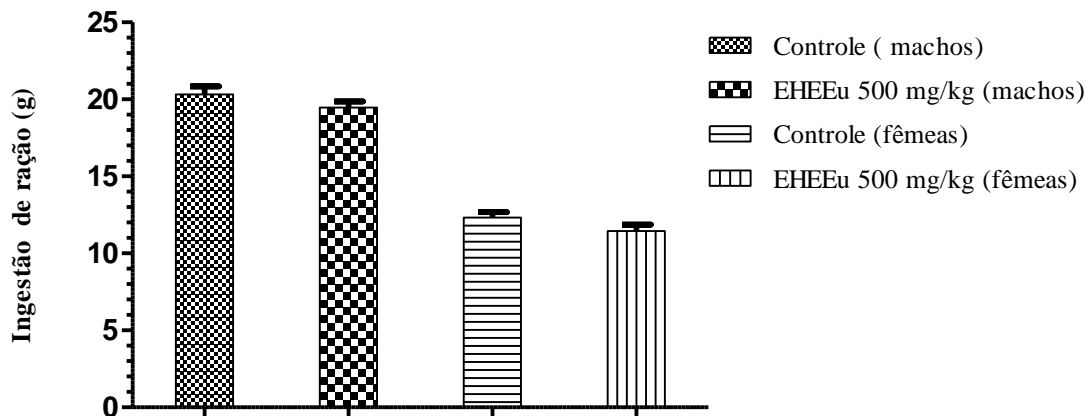


Figura 4 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o consumo diário de ração (g) de ratos (machos e fêmeas), linhagem Wistar, por 22 dias consecutivos. No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

Apesar da ingestão de ração do grupo tratado ter sido menor em relação ao grupo controle (Figura 4), o fato não está associado a efeitos tóxicos do EHEEu, pois não houve interferência no ganho de massa corporal desses animais, ao longo do tratamento. Durante o período experimental, os animais dos diferentes grupos, não apresentaram sinais clínicos de toxicidade e nenhuma morte foi registrada.

Os resultados deste estudo corroboram com os achados por Politi et al. (2010), pois os animais (camudongos machos), após o tratamento oral agudo com extrato de cascas

pulverizadas de *E. uchi* (500 mg/kg, 1.000 mg/kg e 2.000 mg/kg) não apresentaram quaisquer sinais de alterações fisiológicas ou comportamentais, alterações de massa corporal e mortes.

A diminuição da filtração glomerular, de forma geral, leva ao aumento das concentrações plasmáticas de creatinina. Em ratos, níveis plasmáticos alterados de creatinina podem ser um indicador confiável para avaliar a presença da lesão renal, pois seu nível sérico não é influenciado pela dieta, idade ou sexo (ALVES, 2007). A administração do EHEEu não alterou os níveis séricos de creatinina nos animais, a qual indica que a função renal não foi afetada (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu (22 dias consecutivos), preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre os parâmetros bioquímicos de ratos (machos e fêmeas), linhagem Wistar.

	FÊMEAS		MACHOS	
	Controle	EHEEu	Controle	EHEEu
AST (U/L)	241.6 ± 50.0	245.0 ± 39.9	193.2 ± 27.6	228.0 ± 37.1
ALT (U/L)	83.6 ± 22.9	79.0 ± 17.8	53.0 ± 4.8	54.5 ± 5.8
Colesterol total (mg/dL)	66.5 ± 1.8	73.8 ± 4.6	61.6 ± 3.3	65.6 ± 4.2
Colesterol HDL (mg/dL)	31.6 ± 1.2	30.7 ± 1.4	31.2 ± 1.1	30.4 ± 0.8
Triglicérides (mg/dL)	82.0 ± 4.5	76.8 ± 6.3	55.5 ± 2.3	74.4 ± 1.6
FA (U/L)	23.6 ± 2.4	26.2 ± 6.2	90.8 ± 8.9	90.0 ± 17.9
Albumina (g/dL)	3.5 ± 0,0	3.6 ± 0,1	3.7 ± 0.0	3.6 ± 0.0
Glicose (mg/dL)	111.7 ± 20.9	123.3 ± 17.3	154.5 ± 6.75	146.4 ± 13.5
Creatinina (mg/dL)	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média ± E.P.M. Foi aplicado o Teste Mann-Whitney, sendo (n= 5/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle. AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; FA: Fosfatase Alcalina.

Segundo Alves (2007), algumas enzimas podem ser utilizadas como indicadoras de injúria hepática, como a ALT, AST e FA. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST está presente na mitocôndria. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial (MOTTA, 2003).

A FA está presente principalmente tecido ósseo, no sistema hepatobiliar e na mucosa gastrointestinal, sendo indicadora de colestase, que pode levar a um incremento dos níveis séricos em até 10 vezes (SCHEFFER; GONZÁLEZ, 2007). No presente estudo, estas enzimas

não foram alteradas após administração do EHEEu, contudo o nível sérico de AST, tanto nos machos como nas fêmeas (grupo controle e tratado) e ALT, nos machos (controle e tratado) estiveram acima dos valores de referência (Tabela 1) (CLIFFORD; GIKNIS, 2008).

Os níveis de lipídeos são de fundamental importância, pois elevados níveis de colesterol total estão intimamente relacionados com riscos de doenças coronarianas isquêmicas (ARAÚJO et al., 2011). O tratamento dos animais com EHEEu não alterou os níveis de triglicérides e colesterol total, indicando que provavelmente não houve alteração do metabolismo lipídico desses animais. Entretanto, os níveis de colesterol HDL dos animais machos e fêmeas (grupo controle e tratado) mantiveram-se abaixo dos valores de referência (Tabela 1) (DANTAS et al., 2006).

Apesar da existência de mecanismos próprios de controles de valores dos parâmetros fisiológicos, sabe-se que em determinados grupos de animais, como ratos e camundongos, estes podem apresentar variações nesses parâmetros, relacionados principalmente ao gênero, linhagem, genótipo e podem ser influenciados pela idade, dieta, manuseio, ambiente, entre outros fatores (PINHEIRO et al., 2003).

Apesar de alguns parâmetros bioquímicos dos animais tratados com EHEEu estarem abaixo ou acima dos valores de referência, não pode-se atribuir importância clínica, pois os mesmos resultados foram encontrados no grupo controle, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles (Tabela 1). Entretanto, faz-se necessário, o estudo histopatológico do fígado e rins desses animais.

Segundo Silva et al. (2012) os parâmetros hematológicos são importantes para o estudo de toxicidade, devido o sistema hematopoiético ser altamente sensível as atividades dos agentes tóxicos, como aqueles com potencial mutagênico ou citotóxico. Esses agentes tóxicos podem resultar em várias alterações, como qualitativas ou quantitativas, transitórias ou permanente e ainda podem limitar a utilização de medicamentos.

O tratamento oral dos animais com EHEEu, de forma geral não interferiu nas taxas hematológicas, exceto para os valores de concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) dos animais (machos), os quais apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle. A contagem diferencial de linfócitos, monócitos, segmentados e eosinófilos apresentaram valores similares, sem diferenças estatisticamente significativa entre o grupo controle e tratado com EHEEu (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu (22 dias consecutivos), preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre os parâmetros hematológicos de ratos (machos e fêmeas), linhagem Wistar.

	FÊMEAS		MACHOS	
	Controle	EHEEu	Controle	EHEEu
Hm (x10⁶/mm³)	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.3	9.2 ± 0.0	9.1 ± 0.2
Hb (g/dL)	14.8 ± 0.1	15.1 ± 0.5	15.7 ± 0.1	15.9 ± 0.2
Ht (%)	41.3 ± 0.4	40.8 ± 1.7	48.0 ± 0.3	47.0 ± 1.7
VCM (fl)	52.2 ± 0.6	51.5 ± 0.6	52.0 ± 0.3	51.2 ± 0.5
HCM (pg)	18.6 ± 0.1	19.1 ± 0.4	17.0 ± 0.1	17.4 ± 0.2
CHCM (g/dL)	35.7 ± 0.3	37.1 ± 0.5	32.7 ± 0.1	34.7 ± 0.4*
Leucócitos (x10³/mm³)	3.7 ± 0.6	3.4 ± 0.4	3.6 ± 0.6	3.2 ± 0.7
Linfócitos (%)	56.2 ± 3.8	52.2 ± 3.6	63.8 ± 2.1	61.8 ± 1.3
Monócitos (%)	2.4 ± 0.6	3.0 ± 0.3	1.6 ± 0.4	2.0 ± 0.5
Segmentados (%)	40.0 ± 3.5	43.0 ± 3.6	32.6 ± 2.2	34.6 ± 1.2
Eosinófilos (%)	1.4 ± 0.2	1.8 ± 0.3	2.0 ± 0.8	1.6 ± 0.5
Plaquetas (x10³/mm³)	1069.0±35.5	996.25±13.9	1026.3±159.0	1007±63.1

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média ± E.P.M. Foi aplicado o Teste Mann-Whitney, sendo (n= 5/grupo). **p*<0.05 comparado ao grupo controle. Hm: Hemácias; Hb: Hemoglobina; Ht: Hematócrito, VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Segundo Alves (2007), as análises dos índices hematimétricos são importantes indicadores na determinação do tipo morfológico das anemias. O aumento do índice hematimétrico MCHC dos animais machos não tiveram relevância clínica por apresentarem valores dentro da faixa preconizada pelo estudo de Charles River (CLIFFORD; GIKNIS, 2008).

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, pode-se sugerir que o tratamento por via oral com o EHEEu, na dose de 500 mg/kg, por 22 dias, não produziu sinais de toxicidade sistêmica em ratos Wistar, machos e fêmeas quando comparado ao grupo controle. De tal modo, o EHEEu apresentou segurança na dose e no período em que os animais foram expostos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, N. M. **Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) da casca do guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.)**. 2007. 111 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília 2007.
- ARAÚJO, T. O. P.; GOES, L. E. J.; ROCHA, A. G.; COSTA, M. P.; SANTOS, L. H. S.; BERTATO, A. C.; GILENO, M. C. Benefícios da cafeína sobre os níveis séricos de colesterol e triglicerídeos. **Revista Uniara**, v. 14, p. 118-126, 2011.
- BARBOSA, W. L. R.; TAVARES, I. C. C. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. 1 ed. Belém: UFPA, 2001. v. 01. 20 p.
- CLIFFORD, C. B.; GIKNIS, M. L.A. **Clinical Laboratory Parameter for Crl: WI (Han)**, 2008. Disponível em:
<http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_Wistar_Han_clin_lab_parametes_08.pdf>. Acessado em 26 Abr. 2012.
- CUATRECASAS, J. A. A taxonomic revision of Humiriaceae. Contributions from the United States National Herbarium. **Bulletin of the United States National Museum**, 35, part 2, p. 25-214, 1961.
- DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C. A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 28, p. 165-170, 2006.
- F. Bras. V 2010. Farmacopeia Brasileira 5. ed. **Métodos aplicados a medicamentos e físicos e químicos**. Farmacopeia Brasileira 2: 59-93.
- LUNA, J. S.; SILVA, T. M.; BENTO, E. S.; SANT'ANA, A. E. G. Isolamento e Identificação estrutural dos constituintes químicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000, Poços de Caldas-MG: **Livro de Resumos**, v.2, 2000.
- MELLO, F. B. **Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. 2001. 120 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações**. 4 ed. São Paulo: Robe, 2003. 419 p.
- NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; DA SILVA, S. L.; NUNOMURA, S. M. Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1060-1064, 2009.
- OLIVEIRA, C. M.; NONATO, F. R.; LIMA, F. O.; COUTO, R. D.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Antinociceptive properties of bergenin. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2062-8, 2011.

- PINHEIRO, D. C. S. N.; FAVALI, C. B. F.; FILHO, A. A. S.; SILVA, A. C. M.; FILGUEIRAS, T. M.; LIMA, M. G. S. Parâmetros hematológicos de camundongos e ratos do biotério central da Universidade Federal do Ceará. **Bol Inf Cobeia** (3): p. 6 - 9, 1997/1998.
- POLITI, F. A. S.; MELLO, J. C. P.; MIGLIATO, K. F.; NEPOMUCENO, A. L. A.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 2757-2768, 2011.
- POLITI, F. A. S.; MOREIRA, R. R. D.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. Testes preliminares de motilidade intestinal e toxicidade oral aguda com extrato de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) em camundongos. **Revista Pan-Amaz Saude**, v.1, p. 187-189, 2010.
- POLITI, F. A. S. **Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae)**. 2009. 144 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.
- RAZA M.; AL-SHABANAH, O. A.; EL-HADIYAH T. M.; AL-MAJED, A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Sci Pharmacol**, v. 70, p. 135-145. 2002.
- REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 2001. 405p.
- SCHEFFER, J. F. S.; GONZÁLEZ, F. H. D. **Enzimologia clínica em medicina veterinária**. Disponível em: <www6.ufrgs.br/bioquimica/pesquisa/bioqclin/rev._jfss.pdf>. Acesso em 08 Abr. 2012.
- SCHEFFER, M. C. Fisiologia pós-colheita de espécies medicinais, condimentares e aromáticas. In: Wachowicz, CM, Carvalho, R. In. **Fisiologia vegetal: Produção e pós-colheita**. Curitiba: Champagnat, 2002. p. 383-404.
- SCHULTES, R.E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. XXI. Interesting native uses of the Humiriaceae in the northwest Amazon. **Journal Ethnopharmacology**, v. 1, p. 89-94, 1979.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications**. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster (Pennsylvania). 1995. p. 281-319.
- SILVA, E. J. R.; AGUIAR, F. J. S.; GONÇALVES, E. S.; SOUZA, I. M. V.; DIMECH, G. S.; FRAGA, M.C. C. A.; COELHO, M. C. O. C.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcolico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 88 - 93, 2005.
- SILVA, S. L.; OLIVEIRA, V. G.; YANO, T.; NUNOMURA, R. C. S. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta amazônica**, v. 39, p. 177-182, 2009.

SILVA, S. N.; ABREU, I. C.; SILVA, G. F. C.; RIBEIRO, R. M.; LOPES, A. S.; CARTAGENES, M. S. S.; FREIRE, S. M. F.; BORGES, A. C. R.; BORGES, M. O. R. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 102-108, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC. 2004.

SOUSA, S. A. **Desenvolvimento e avaliação de métodos analíticos de HPLC e ensaios de dissolução para avaliação da qualidade de fitoterápicos contendo *Paulinia cupana kunth***. 2009. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Brasil, 2009.

TAKAHASHI, H.; KOSAKA, M.; WATANABE, Y.; NAKADE, K.; FUKUYAMA, Y. Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1781-8, 2003.

TEO, S., STIRLING, D. THOMAS, S., HOBERMAN, A., KIORPES, A., KHETANI, V. A. 90 day oral gavage toxicity study of D- methylphenidate and D, L-methylphenidate in Sprague Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183-196, 2002.

TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal Cardiovasc Pharmacol**, v. 33, p. 360-366, 1999.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289-306, 2006.

VEIGA-JÚNIOR, V. F; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

**CAPITULO 2: AVALIAÇÃO DA TOXIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, EM RATAS WISTAR,
NO PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO E ORGANOGÊNESE.**

RESUMO

A espécie botânica *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. pertence a família Humiriaceae, sendo conhecida popularmente como uxi, uxi-ordinário, uxi-pucu, uxi-amarelo, uxi-liso, cumatê e pururu. Tal espécie é bastante utilizada para o tratamento de miomas uterinos e afecções do trato genito urinário feminino. O objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade reprodutiva do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *Endopleura uchi* (EHEEu), em dois períodos críticos de desenvolvimento de prenhez de ratas, o período de pré-implantação e o período de organogênese. Tanto no período de pré-implantação como no de organogênese, ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), isogênicas, foram divididas em dois grupos (n=6/grupo), sendo que o grupo tratado recebeu por via oral a dose de 500 mg/kg de EHEEu nos dias d0-d5 de prenhez (período de pré-implantação) e d6-15 de prenhez (período de organogênese), e o grupo controle 0,5 mL de água destilada durante o mesmo período. No 21º dia de gestação os animais foram submetidos a laparotomia, e todos os RN's foram pesados e verificados quanto a análise das anomalias e/ou malformações externas. Posteriormente, metade de cada ninhada foi separada e processada para a análise das anomalias e/ou malformações internas (esqueléticas e viscerais) e contagem dos pontos de ossificação. Os resultados evidenciaram que o tratamento com o EHEEu no período de pré-implantação não provocou toxicidade materna, não alterou os parâmetros reprodutivos maternos, não alterou a contagem dos pontos de ossificação, nem causou embriofetotoxicidade e teratogenicidade na prole. Quanto ao período de organogênese, o tratamento com o EHEEu também não produziu toxicidade nas progênitoras, não alterou a contagem dos pontos de ossificação, assim como não causou embriofetotoxicidade e teratogenicidade na prole. Contudo, o tratamento com o EHEEu, aumentou significativamente o número de perdas pós-implantes, com consequente aumento, também significativo, do índice de reabsorções do grupo tratado em relação ao grupo controle. Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que o EHEEu (500 mg/kg) não provocou efeitos adversos no período de pré-implantação do blastocisto, porém, provocou perdas pós-implantes no período de organogênese.

Palavras-chave: *Endopleura uchi*. Toxicidade Reprodutiva. Período de Pré-implantação. Período de Organogênese. Teratogenicidade.

ABSTRACT

The botanical species *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. belongs to the family *Humiriaceae*, also popularly known as uxi, uxi-ordinary, uxi-pucu, uxi-amarelo, uxi-liso, cumatê and pururu. Such species is quite used for the treatment of uterine myomas and disorder of the female genitourinary tract. The objective of the present study was to evaluate the reproductive toxicity of the hydroethanolic extract of the peels of the stem of *E. uchi* (EHEEu), in two critical periods of development of pregnancy in female rats, the pre-implantation period and the organogenesis period. In the pre-implantation period as well as in one of organogenesis, female Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), isogonics, were divided in two groups (n=6/grupo), and the treated group received a dose of 500 mg/kg of EHEEu orally in the days of pregnancy d0-d5 (pre-implantation period) and pregnancy d6-15 (organogenesis period), and the control group 0,5 mL of distilled water during the same period. Laparotomy was performed on the 21st day of the animals' pregnancy, where all the newborns were weighed and verified about the analysis of the anomalies and/or external malformations. Later, half of each brood was separated and processed for the analysis of the anomalies and/or internal malformations (skeletal and visceral) and counting of the ossification points. The results evidenced that the treatment with EHEEu in the pre-implantation period did not cause maternal toxicity, it did not change the maternal reproductive parameters, it did not change the counting of the ossification points, as well did not caused embryofetotoxicity and teratogenicity in the offspring. About the organogenesis period, the treatment with EHEEu did not also produce toxicity in the progenitors; it did not change the counting of the ossification points, as well as it didn't cause embryofetotoxicity and teratogenicity in the offspring. However, the treatment with EHEEu, increased the number of losses post-implants significantly, with consequent rise, also significant, of the resorptions in the treated group in relation to the control one. According to these results, it is possible to conclude that EHEEu (500 mg/kg) did not provoke adverse effects in the period of pre-implantation of the blastocyst; however, it provoked losses post-implants in the organogenesis period.

Keywords: *Endopleura uchi*. Reproductive Toxicity. Pre-implantation Period. Organogenesis Period. Teratogenicity.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas como recursos terapêuticos por pessoas de diversas partes do mundo, desde a antiguidade. Contudo, por muito tempo, também foram utilizadas, seja por razões econômicas ou culturais como a principal alternativa de cura para a população mundial (SANTOS, 2012). A fitoterapia, conhecida como a prática da medicina popular é usada como forma alternativa no que diz respeito aos cuidados com a saúde. Sendo que tal prática apresentou uma evolução considerável nos últimos anos, entre todos os segmentos socioeconômicos da população, apresentando-se atualmente como um importante setor econômico no Brasil (SACHETTI, 2010).

Segundo Mengue; Mentz e Schenkel (2001), o surgimento do conceito de “natural” contribuiu bastante para o aumento do uso de plantas medicinais nas últimas décadas. Para muitos, esse conceito significa “ausência de produtos químicos”, conhecidos como aquelas que podem apresentar algum dano, ou de outra forma, representam perigo para a saúde. Então, os produtos naturais passaram a ser sinônimo de produtos saudáveis, seguros e benéficos. Entretanto, tal conceito é extremamente equivocado, pois as plantas são grandes fontes de substâncias capazes de provocar efeitos tóxicos nos organismos vivos.

Quando se faz uso de qualquer medicamento no período gestacional, é necessário levar em conta a relação risco-benefício. Sendo que se deve aplicar o mesmo cuidado em relação ao uso de plantas medicinais. Nesse contexto, para cada situação específica, deve ser estabelecida uma relação risco-benefício (MENGUE; MENTZ; SCHENKEI, 2001).

No entanto, se para muitos medicamentos as informações disponíveis são escassas, para as plantas medicinais essa carência de dados é ainda mais acentuada. (MENGUE; MENTZ; SCHENKEI, 2001). Para a maioria das plantas medicinais não há dados a respeito da segurança de seu uso durante a gravidez (RODRIGUES et al., 2011). Assim, na presença de algum dado que sugira risco para a gestação, plantas medicinais devem ser evitadas, até que evidências garantam o seu uso de forma seguro (MENGUE; MENTZ; SCHENKEI, 2001).

Poucas substâncias químicas foram comprovadas quanto ao seu efeito teratogênico. Esse baixo número de tais comprovações se deve às dificuldades de investigação de teratogenicidade nos humanos (SCHÜLER-FACCINI et al., 2002). Sendo que o rato é um dos modelos experimentais mais utilizados em estudos relacionados com a teratogenicidade (CARMO, PETER; GUERRA, 2007).

Segundo Hansen e Harris (2013) a maior parte dos defeitos congênitos humanos é ocasionada por fatores desconhecidos, variando em torno de 43-65%. Contudo, algumas causas de tais defeitos congênitos são de origem conhecida, onde a maior parte é representada por fatores genéticos (25-28%). Vale ressaltar que produtos químicos e outros fatores ambientais também contribuem, apesar de muitos destes defeitos ao nascimento serem considerados de origem multifatorial (25%), ou seja, resultam do sinergismo entre fatores genéticos e ambientais.

A prenhez de ratos pode ser analisada em três períodos distintos, conhecidos como pré-implantação, organogênese e fetal (FRITZ; GIESE, 1990). Na gestação, o período de pré-implantação é compreendido como uma fase muito delicada que requer uma perfeita coordenação dos eventos fisiológicos necessários tanto para a manutenção quanto para o sucesso da gravidez (BLAIR; WRAY; SMITH, 20011; STAMATKIN et al., 2011).

Os efeitos teratogênicos são observáveis particularmente no período de organogênese, pois é quando as estruturas em diferenciação estão mais sensíveis aos efeitos que possíveis teratógenos podem provocar. Além de que cada órgão apresenta um período crítico de desenvolvimento, tornando precisamente este momento como o mais sensível a agentes teratogênicos (CARMO, PETER; GUERRA, 2007).

Segundo Tacon (2012), *Endopleura uchi* é uma das plantas brasileiras que tem despertado muito interesse, por ser alvo de muitos estudos, podendo possivelmente tornar-se um produto fitoterápico. Na literatura, os estudos relacionados à espécie botânica *E. uchi*, abordam frutos (NEVES et al., 2012; COSTA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2007; MARX et al., 2002;) e cascas do caule (BENTO; NOLETO; PETKOWICZ, 2014; TACON; FREITAS, 2013; ABREU et al., 2013; BORGES et al., 2011; POLITI et al., 2011; POLITI et al., 2010; NUNOMURA et al., 2009; POLITI, 2009; SILVA et al., 2009; ABREU et al., 2008).

Apesar das cascas do caule de *E. uchi* serem utilizadas pela população para diversos fins terapêuticos, principalmente para o tratamento de miomas uterinos, nota-se que até o presente momento nenhum estudo sustenta a segurança do seu uso durante o período gestacional. Assim, este capítulo teve como objetivo avaliar a possível toxicidade reprodutiva, após a administração oral do extrato hidroetanólico das cascas de *E. uchi* (500 mg/kg) em dois períodos de desenvolvimento de prenhez de ratas, o período de pré-implantação e o período de organogênese (segmento II), também conhecido como período de pós-implantação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A execução dos diversos protocolos experimentais ocorreu no Laboratório de Pesquisa em Fármacos, do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, situado na Rodovia Juscelino Kubitschek, Km-02 - Zerão – Macapá, AP- Brasil.

2.1 MATERIAL BOTÂNICO

O pó das cascas do caule de *E. uchi* (464g) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da UFPA, sendo que este material botânico foi coletado na região metropolitana de Belém, Estado do Pará, Brasil em 03 de abril de 2005, em mata de terra firme e a identificação efetuada por botânicos da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), cuja exsicata encontra-se depositada no herbário da referida instituição sob código nº 180611.

2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

As cascas do caule de *E. uchi* foram dessecadas em estufa de ar circulante a 40°C, por 72 h e após sua secagem, trituradas em moinho de facas, obtendo-se o pó da planta (464g). Posteriormente, este material foi macerado em solução hidroalcoólica a 75%, na proporção de 1:5 em temperatura ambiente, durante 7 dias, sob agitação constante (BARBOSA e TAVARES, 2001). Em seguida, o macerado foi filtrado e concentrado em rotaevaporador (QUIMIS, Modelo Q. 218.2), na temperatura de 40°C, até a evaporação completa do solvente. O filtrado concentrado foi submetido à liofilização fornecendo 10.65% de rendimento.

2.3 DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, isogênicos, machos e fêmeas em idade reprodutiva (três meses), com peso em torno de 200g a 250g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade de Campinas – UNICAMP e do Biotério do Laboratório Central do Amapá (LACEN – AP).

O projeto de dissertação foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá, com o registro CEP – UNIFAP 001A/2012.

2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em dois ensaios experimentais (Experimento I e Experimento II), onde cada ensaio continha dois grupos (grupo controle (GI) e grupo tratado (GII)) (Quadro 1).

Quadro 1 - Grupos experimentais para avaliar a performance reprodutiva de *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, fêmeas, tratados com o EHEEu e água destilada.

EXPERIMENTOS	GRUPOS
(I) - Pré-implantação (d0-d5)	EXP. I GI: Ratas prenhes, que receberam por via oral, 0,5 mL de água destilada, no período de pré-implantação (n = 6);
	EXP. I GII: Ratas prenhes, que receberam por via oral, uma dose correspondente a 500 mg/kg do EHEEu, no período de pré-implantação (n = 6);
(II) - Organogênese (pós-implantação) (d6-d15)	EXP. II GI: Ratas prenhes, que receberam por via oral, 0,5 mL de água destilada, no período de organogênese (n = 6);
	EXP. II GII: Ratas prenhes, que receberam por via oral, uma dose correspondente a 500 mg/kg do EHEEu, no período de organogênese (n = 6);

2.5 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Foi dividida em três períodos: de adaptação, de identificação do ciclo estral, e de acasalamento.

2.5.1 Período de adaptação

As ratas passaram por um período de adaptação, no Laboratório de Pesquisa em Fármacos durante quinze dias, permanecendo em estantes ventiladas (Alesco®), em caixas de polipropileno, com capacidade máxima de cinco animais (Figura 1), sob temperatura

controlada ($23\pm 2^\circ\text{C}$) e obedecendo a um ciclo claro/escuro (fotoperíodo) de 12 horas (período claro das 7:00 h da manhã as 19:00 h da noite) e receberam água e ração (Labina®) à vontade.



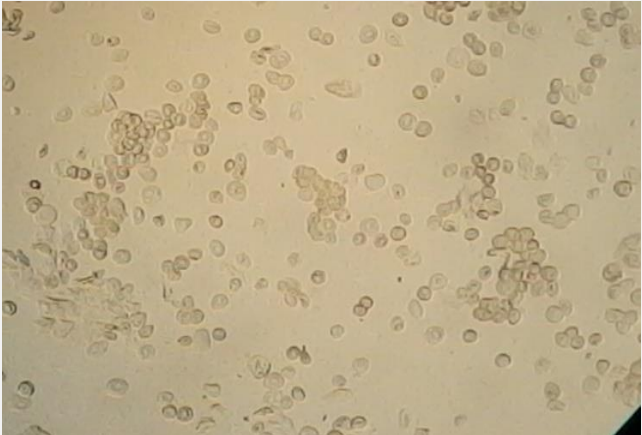
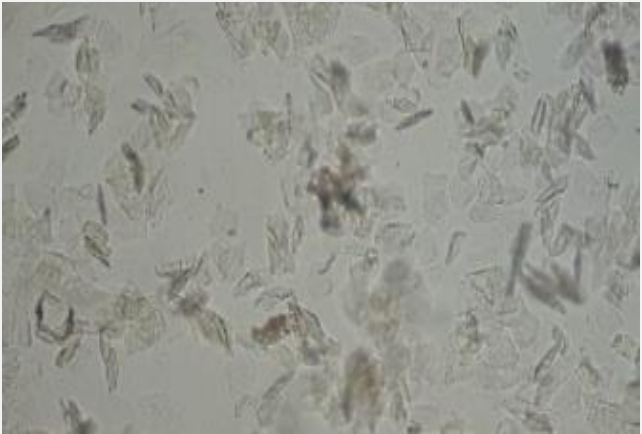
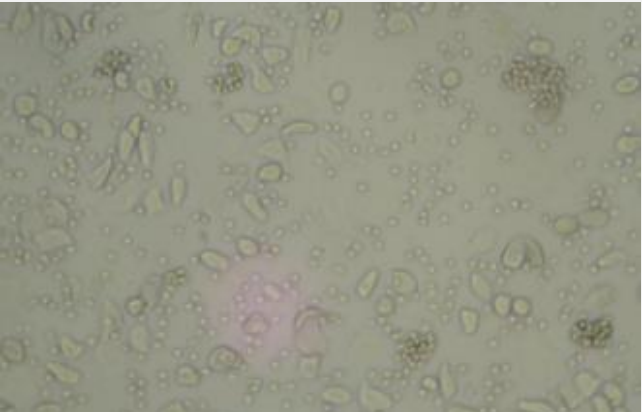
Figura 1 - Estante ventilada utilizada para acondicionar os animais durante todas as fases experimentais
Fonte do autor


2.5.2 Identificação das fases do ciclo estral das ratas

Após as ratas terem passado pelo período de adaptação, iniciou-se o processo de identificação das fases do ciclo estral por meio de um esfregaço vaginal que ocorria sempre pela manhã (8:00 h), com duração de aproximadamente 20 dias. Os esfregaços eram realizados com auxílio de uma micropipeta, por meio da lavagem vaginal com $10\ \mu\text{L}$ de solução de cloreto de sódio a 0,9% e posterior avaliação, a fresco, em microscopia óptica (aumento 40x) conforme a metodologia descrita por Marcondes; Bianchi; Tanno (2002).

O ciclo estral de ratas tem duração média de quatro ou cinco dias e é caracterizado por quatro fases, proestro, estro, metaestro (diestro I) e diestro (diestro II), as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002) (Quadro 2).

Quadro 2 - As quatro fases do ciclo estral de *Rattus norvegicus albinus* (fêmeas), mediante exame de citologia vaginal.

FASE	CARACTERÍSTICAS
<p style="text-align: center;">Proestro (12 h)</p> <p>Grande número de células epiteliais nucleadas, algumas células epiteliais queratinizadas (sem núcleo) e ausência total de leucócitos;</p>	
<p style="text-align: center;">Estro (14 h)</p> <p>Presença de células queratinizadas e ausência total de leucócitos. A ovulação ocorre espontaneamente na metade do ciclo escuro durante esta fase;</p>	
<p style="text-align: center;">Metaestro (21 h)</p> <p>Inúmeros leucócitos, filamentos de muco e resíduos de células epiteliais queratinizadas;</p>	

<p style="text-align: center;">Diestro (57 h)</p> <p>Período de repouso em que a mucosa vaginal apresenta-se delgada, com leucócitos e algumas células nucleadas.</p>	
--	--

Fonte do autor

2.5.3 Período de acasalamento

Nesta fase, fêmeas nulíparas foram colocadas em contato com machos adultos na fase escura do ciclo (proestro) para o acasalamento na proporção de duas (2) fêmeas para um (1) macho. Na manhã seguinte, realizaram-se os lavados vaginais. Foi considerada como indicativo de prenhez a presença de espermatozóides, associado ao diagnóstico da fase estro do ciclo estral. Esta fase é considerada como a fase estrogênica máxima, onde são encontradas apenas células queratinizadas. Assim, confirmada a prenhez, convencionou-se esse dia como dia 0 (zero) de prenhez (d0) e as fêmeas foram mantidas em caixas individuais de polipropileno (414 x 344 x 168 mm). Os acasalamentos foram repetidos diariamente até a obtenção do número suficiente de progenitoras de acordo com cada experimento realizado.

2.6 EXPERIMENTO I - EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO DE PRÉ-IMPLANTAÇÃO

2.6.1 Período de tratamento (d0 – d5)

Neste experimento, fêmeas prenhas (n=6/grupo), tanto do grupo controle (EIGI) como do grupo tratado (EIGII), foram tratadas uma vez ao dia, via oral, com água destilada (5 mL) e HHEEu (500 mg/kg), respectivamente, na fase de pré-implantação do blastocisto no útero, que acontece cinco a seis dias após a fecundação (ALMEIDA; LEMÔNICA, 2000; BERNARDI et al., 2002). Desta forma, a duração do tratamento correspondeu do d0 ao d5 de prenhez.

2.6.2 Avaliação da toxicidade aguda nas progenitoras

Durante o período de tratamento, as progenitoras foram avaliadas quanto à presença de manifestações de vários sinais de toxicidade aguda, tal como: diarreia, piloereção, estresse, tremores, salivação e sangramento.

2.6.3 Avaliação do desenvolvimento ponderal das progenitoras

No que diz respeito ao ganho de massa das progenitoras, a massa corporal de cada uma foi registrada nos dias d0, d3, d6, d9, d12, d15, d18 e d21 de prenhez, com a utilização de uma balança Gehaka BG 4000, com capacidade de 4200 g e precisão de 0,01 g.

2.6.4 Avaliação do consumo de água e ração das progenitoras

Também foi mensurado o consumo de água e ração durante os mesmos dias de prenhez e condições citados acima. Onde, diariamente, eram disponibilizado 50g de ração e 250 mL de água para cada rata prenha.

2.6.5 Avaliação da performance reprodutiva

No 21º dia de prenhez (d21) as ratas foram anestesiadas com 50 mg/kg de tiopental sódico (THIOPENTAX[®]) e realizado a laparotomia com exposição dos cornos uterinos para observação dos nódulos de reabsorção e retirada dos ovários para contagem de corpos lúteos. Após a contagem dos implantes, fetos e placentas foram imediatamente retirados, analisados e posteriormente, pesados. As mães foram sacrificados por inalação em câmara de CO₂, sendo descartados juntamente com o lixo hospitalar da Policlínica da Universidade Federal do Amapá, o qual é recolhido por uma empresa privada especializada que possui convênio com a Universidade Federal do Amapá para ser incinerado. As variáveis investigadas foram:

2.6.5.1 Perdas pré-implantes

As perdas pré-implantes foram determinadas conforme a seguinte fórmula (ALMEIDA; LEMÔNICA, 2000).

$$\text{Perdas pré-implantes} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de implantes}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}} \times 100$$

Os corpos lúteos foram contados com auxílio de uma lupa NIKOW[®], modelo SMZ 645 (C-W 10x A/22) e os implantes foram contados a olho nu, como mostram as figuras 2 e 3 abaixo.

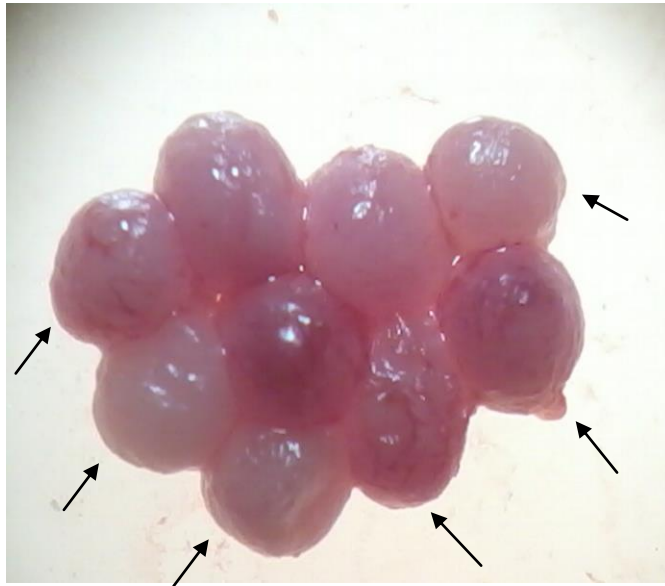


Figura 2 - Ovário de rata Wistar no 21º dia de prenhez. As setas indicam corpos lúteos gravídicos. Fonte do autor.

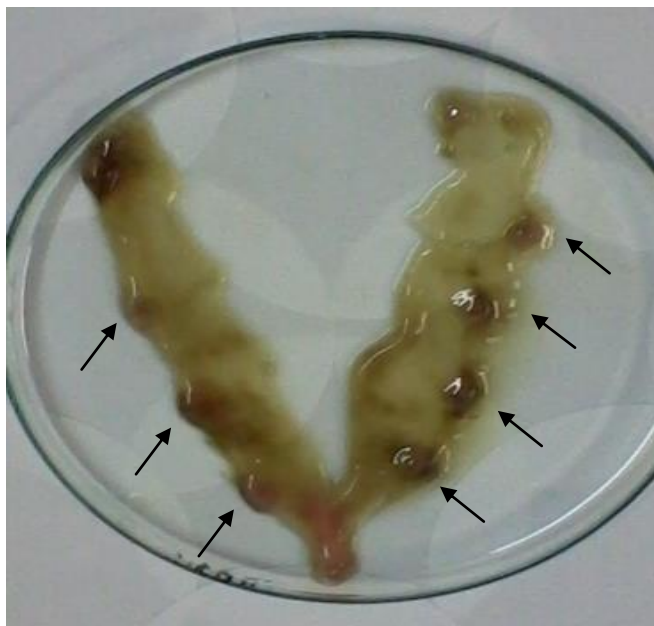


Figura 3 - Útero gravídico de rata Wistar no 21º dia de prenhez. As setas indicam pontos de implantação uterina. Fonte do autor.

2.6.5.2 Perdas pós-implantes

As perdas pós-implantes foram determinadas conforme a seguinte fórmula descrita por Almeida e Lemônica (2000).

$$\text{Perdas pós-implantes} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de implantes} - \text{n}^\circ \text{ de nativos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantes}} \times 100$$

2.6.5.3 Índice de reabsorções

$$\text{Índice de reabsorções} = \frac{\text{n}^\circ \text{ reabsorções}}{\text{n}^\circ \text{ implantes}} \times 100$$

Sendo o n° de reabsorções = n° implantes – n° filhotes nascidos

2.6.5.4 Índice de parto

$$\text{Índice de parto} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas que pariram}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas com evidência de prenhez}} \times 100$$

2.6.5.5 Índice de nascimento

$$\text{Índice de nascimento} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de nativos}}{\text{n}^\circ \text{ de filhotes nascidos}} \times 100$$

2.6.5.6 Peso dos fetos, das placentas e índice placentário

As placentas (livres de membrana e cordão umbilical) e os fetos foram pesados (balança Marte com capacidade de 500 g e precisão de 0,001 g). O índice placentário (IP) foi determinado pela relação entre o peso placentário (PP) e o peso fetal (PF) (CALDERON, 1998).

$$\text{IP} = \frac{\text{PP}}{\text{PF}}$$

2.6.6 Avaliação da embriofetotoxicidade

2.6.6.1 Peso e classificação dos recém-nascidos (RNs)

Após a laparotomia, os RNs foram pesados e classificados em AIP (Adequado para Idade de Prenhez), PIP (Pequeno para Idade de Prenhez) e GIP (Grande para Idade de Prenhez), segundo os parâmetros estabelecidos por Calderon (1988):

- **AIP:** Peso corpóreo compreendido entre a média de peso do grupo controle mais ou menos o desvio-padrão;
- **PIP:** Peso corpóreo inferior à média de peso do grupo controle menos o desvio-padrão;
- **GIP:** Peso corpóreo superior à média do peso do grupo controle mais o desvio-padrão.

2.6.7 Teratogenicidade

2.6.7.1 Análise das anomalias e/ou malformações externas

Após a pesagem, os RNs foram examinados externamente, com análise minuciosa dos olhos, boca, implantação das orelhas, conformação craniana, membros anteriores e posteriores, perfuração anal e cauda (WILSON, 1965) (Figura 4).

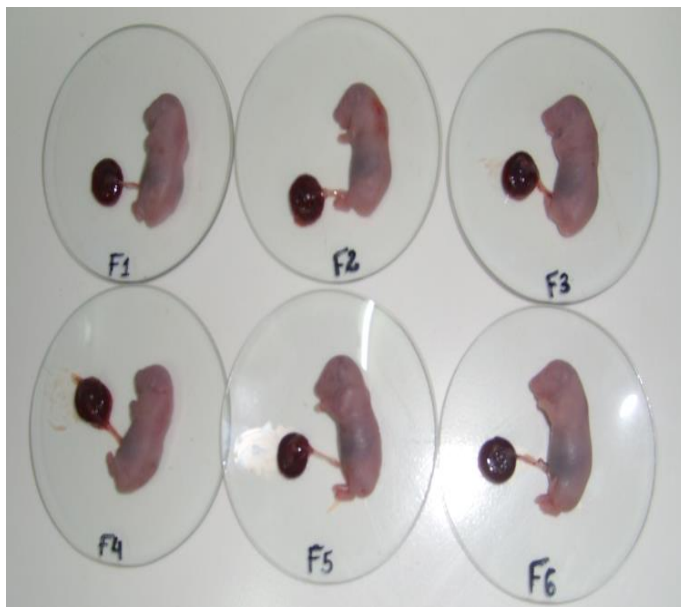


Figura 4 - Análise das anomalias e/ou malformações externas dos RNs de rata Wistar.
Fonte do autor.

2.6.7.2 Análise das anomalias e/ou malformações internas

2.6.7.2.1 Processamento, análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas e contagem dos pontos de ossificação

Imediatamente após a análise externa dos RNs, a metade de cada ninhada foi colocada em álcool 70% (12 h) e posteriormente em acetona P.A (24 h), depois foram eviscerados, diafanizados e corados com vermelho de alizarina, conforme a metodologia descrita por Staples e Schnell (1964). Após a obtenção da coloração do esqueleto, os fetos foram conservados em glicerina 100%. (Figura 5).



Figura 5 - Processamento e análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas dos RNs de rata Wistar.

Fonte do autor.

As análises foram realizadas com o auxílio de um estereomicroscópio NIKOW[®], modelo SMZ 645 (C-W 10 x A/22). As anomalias e/ou malformações investigadas foram segundo Volpato (2001) (Quadro 3).

Quadro 3 - Anomalias e malformações investigadas no exame esquelético.

Estruturas	Malformações	Anomalias
Crânio	Fusão frontal	Ossificação reduzida
Esterno	Esterno bífido	Esternébrio atrofiado, bipartido, supranumerário, rudimentar e assimétrico (“shaped”, “borboleta”).
Vértebras	Agenesia vertebral, Fusão de vértebras.	Corpo vertebral sem ossificação, Anomalias semelhantes as dos esternébrios.
Costelas	Agenesia de costelas, Duplicação de costelas, Hipoplasia de costelas e Fusão de vértebras.	Costela ondulada, Costela extra, uni ou bilateral e 13 ^a costela reduzida.
Bacia	Hipoplasia de bacia	Ossificação reduzida (ílio, ísquio e púbis).
Clavícula	Agenesia de clavícula	

Falanges	Agenesia de falanges, Fusão de falanges, Hiperfalangia	
Metacarpo	Fusão do metacarpo	
Metatarso	Fusão do metatarso	

Quanto aos pontos de ossificação, estes foram observados e contados, segundo método proposto por Aliverti et al. (1979). Sendo que os locais de avaliação foram: esterno, falanges anteriores e posteriores, metacarpos, metatarsos e vértebras cervicais e caudais.

2.6.7.2.2 *Processamento e análise das anomalias e/ou malformações viscerais*

Para o processamento e análise das anomalias e/ou malformações viscerais, a outra metade dos RNs de cada ninhada foi colocada em solução de Bouin por quatro (4) dias para fixação das estruturas viscerais e descalcificação dos ossos, e posteriormente foi colocado em álcool 70% até o dia da análise (Figura 6). O método de secção seriada de Wilson (1965) foi utilizado para observar anomalias e/ou malformações viscerais. As análises foram realizadas com o auxílio de estereomicroscópio NIKOW[®], modelo SMZ 645 (C-W 10 x A/22) (Figura 7).

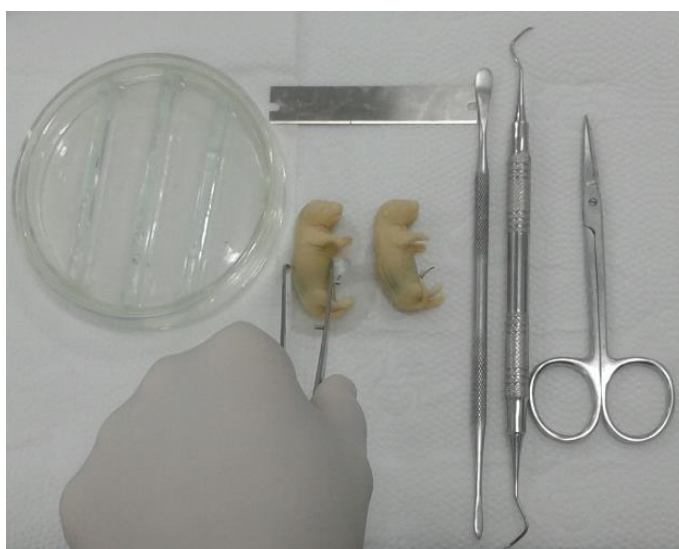


Figura 6 - Processamento dos RNs de rata Wistar.
Fonte do autor.

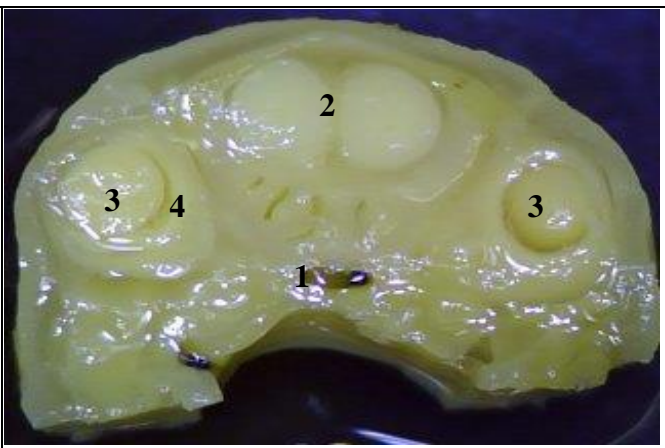
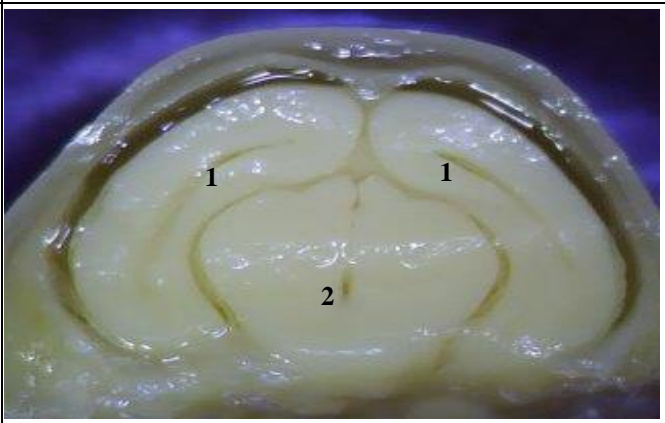
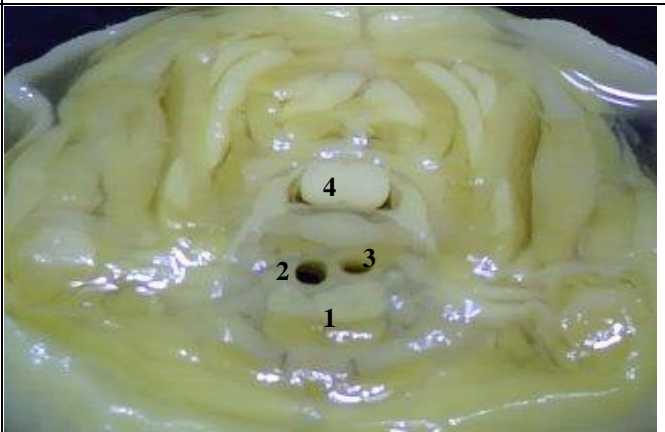
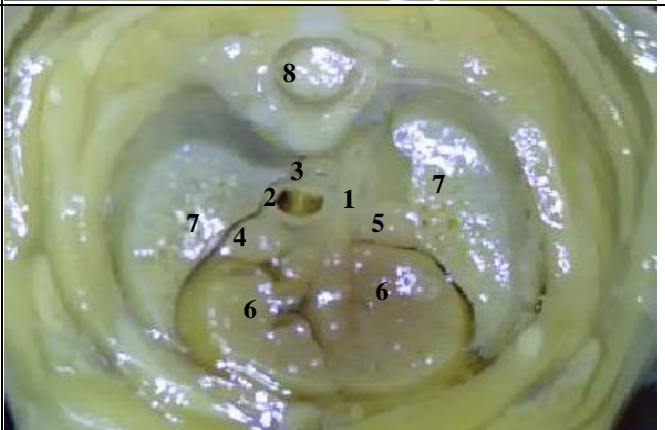


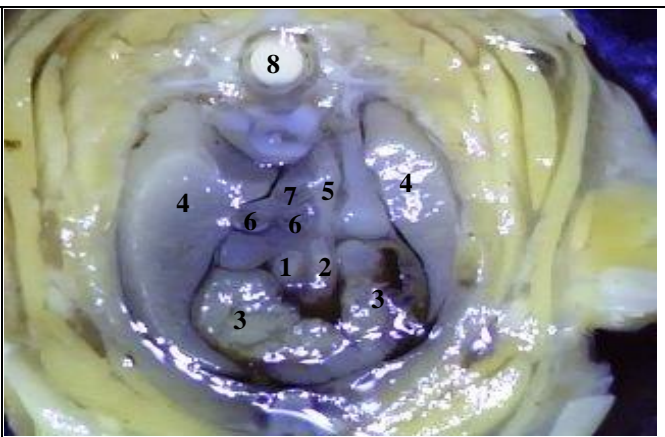
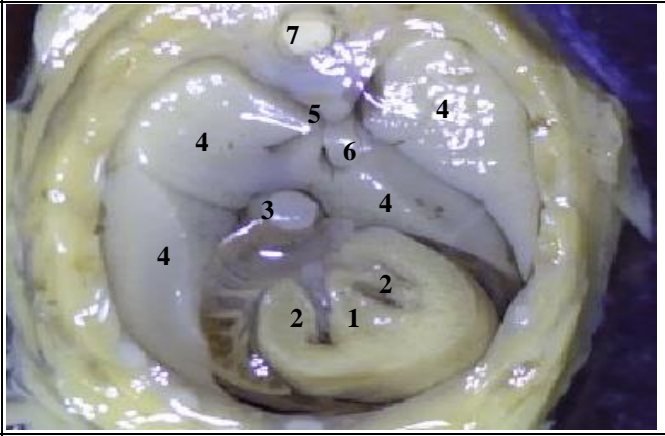
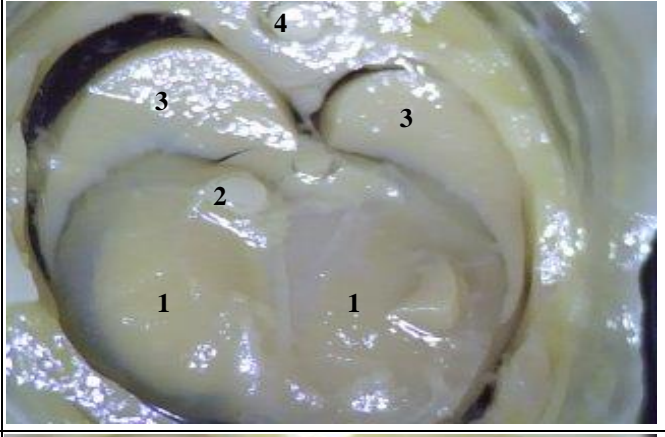
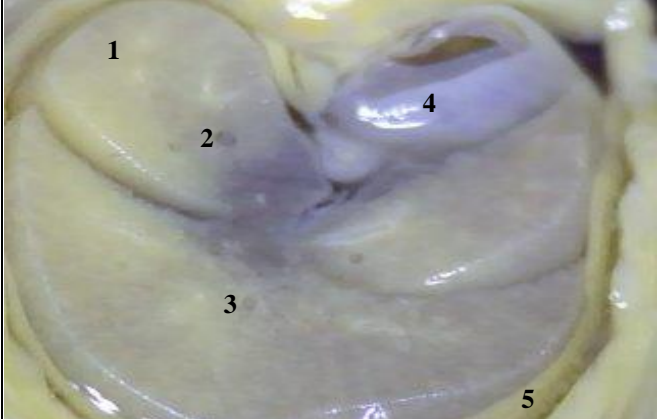
Figura 7 - Secções seriadas de Wilson (1965) de rata Wistar.
Fonte do autor.

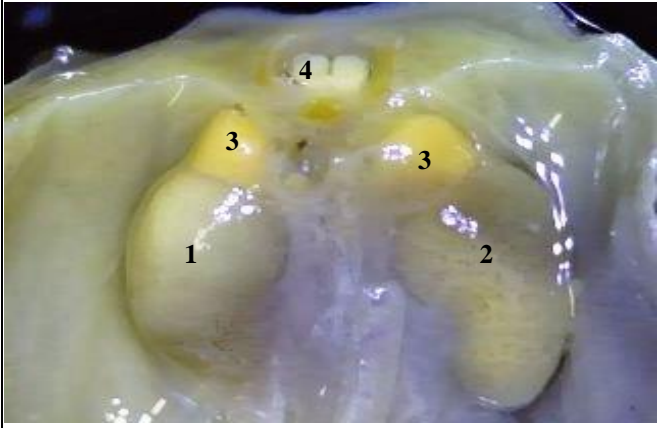


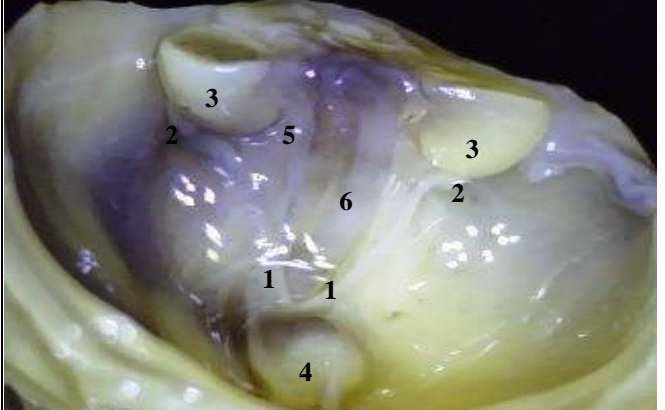
A análise visceral consiste em seccionar transversalmente os fetos, de maneira que seja possível a avaliação de possíveis alterações e/ou malformações viscerais. As secções analisadas foram: da cabeça (palato, septo nasal, coana, bulbo olfatório, cristalino, retina, ventrículos laterais e 3º ventrículo), tórax (traquéia, esôfago, timo, medula, jugular, veia cava superior, átrios, arco da aorta, veia pulmonar, pulmões, ventrículos, septos interventriculares), abdômen (diafragma, veia cava inferior e veia hepática), pelve renal (rins, ureteres, bexiga e reto) e órgãos reprodutores (macho: testículos, epidídimo, canal deferente; fêmea: ovários e útero) (Quadro 4).

Quadro 4 - Secções seriadas de Wilson (1965).

	SECÇÕES
Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção da Cabeça (1) Septo Nasal e (2) Coana e (3) Palato.	

<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção da Cabeça (1) Coana, (2) Bulbo Olfatório, (3) Cristalino e (4) Retina.</p>	
<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção da Cabeça (1) Ventriculos Laterais e (2) 3º Ventriculo.</p>	
<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção do Tórax. (1) Timo, (2) traquéia, (3) Esôfago e (4) Medula Espinhal.</p>	
<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção do Tórax. (1) Arco da Aorta, (2) Traquéia, (3) Esôfago e (4) Veia Cava Superior, (5) Veia Pulmonar, (6) Átrios, (7) Pulmões e (8) Medula Espinhal.</p>	

<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção do Tórax. (1) Aorta Ascendente, (2) Tronco Pulmonar, (3) Átrios (4) Pulmões, (5) Aorta Descendente, (6) Brônquios, (7) Esôfago e (8) Medula Espinhal.</p>	
<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção do Tórax (1) Septo Interventricular, (2) Ventricúlos Direito e Esquerdo, (3) Veia Cava Inferior, (4) Os Quatro Lobos do Pulmão, (5) Aorta Descendente, (6) Esôfago e (7) Medula Espinhal.</p>	
<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção do Abdômen (1) Diafragma, (2) Veia Cava Inferior, (3) Pulmões e (4) Medula Espinhal.</p>	
<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção do Abdômen (1) Fígado, (2) Veia Cava Inferior, (3) Veia Hepática, (4) Ápice do Estômago e (5) Diafragma.</p>	

<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção do Abdômen (1) Rim Direito, (2) Rim Esquerdo, (3) Glândula Suprarrenal, (4) Medula Espinhal.</p>	
<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção da Pelve (1) Papila Renal, (2) Pelve Renal, (3) Rins e (4) Medula Espinhal.</p>	
<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção da Pelve e Análise do Órgão Reprodutor Masculino (1) Testículos, (2) Epidídimo, (3) Canal Deferente, (4) Bexiga.</p>	
<p>Análise das secções seriadas de Wilson (1965). Secção da Pelve e Análise do Órgão Reprodutor Feminino (1) Útero (cornos uterinos direito e esquerdo), (2) Ovários Direito e Esquerdo, abaixo dos (3) Rins, (4) Bexiga, (5) Ureter e (6) Reto.</p>	

Fotos: fonte do autor.

As alterações e/ou malformações investigadas foram: palatosquese, língua bífida, alterações do septo nasal, microftalmia e macroftalmia (mono ou bilateral), anoftalmia, retina dobrada, lente degradada, anencefalia, hidrocefalia em diversos graus, fístula traqueoesofágica, arco da aorta duplo ou voltado à direita, destrocardia, sinistocardia, cardiomegalia, comunicação intratrial, alteração no septo interventricular, pulmão pequeno ou grande, hérnia do diafragma, agenesia renal, ectopia renal, hidronefrose, fusão renal, hipoplasia ou hiperplasia renal, agenesia de ureter, fusão do ureter, duplicação do ureter, dilatação do ureter (mono ou bilateral), hiperplasia ou hipoplasia vesical.

2.7 EXPERIMENTO II – EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO DE ORGANOGÊNESE

2.7.1 Período de tratamento (d6-d15)

Neste experimento, fêmeas prenhas (n=6/grupo), tanto do grupo controle (EIIGI) como do grupo tratado (EIIGII), foram tratadas uma vez ao dia, via oral, com água destilada (5 mL) e EHEEu (500 mg/kg) respectivamente, na fase de pós-implantação do blastocisto no útero, que correspondeu do d6 de prenhez ao d15 de prenhez (ALMEIDA; LEMÔNICA, 2000; BERNARDI et al., 2002).

2.7.2 Avaliação da toxicidade aguda nas progenitoras

Idem item 2.6.2

2.7.3 Avaliação do desenvolvimento ponderal das progenitoras

Idem item 2.6.3

2.7.4 Avaliação do consumo de água e ração das progenitoras

Idem item 2.6.4

2.7.5 Avaliação da performance reprodutiva

Idem item 2.6.5

2.7.5.1 Perdas pré-implantes

Idem item **2.6.5.1**

2.7.5.2 Perdas pós-implantes

Idem item **2.6.5.2**

2.7.5.3 Índice de reabsorções

Idem item **2.6.5.3**

2.7.5.4 Índice de parto

Idem item **2.6.5.4**

2.7.5.5 Índice de nascimento

Idem item **2.6.5.5**

2.7.5.6 Peso dos fetos, das placentas e índice placentário

Idem item **2.6.5.6**

2.7.6 Avaliação da embriofetotoxicidade

Idem item **2.6.6**

2.7.6.1 Peso e classificação dos recém-nascidos (RNs)

Idem item **2.6.6.**

2.7.7 Teratogenicidade

Idem item **2.6.7**

2.7.7.1 Análise das anomalias e/ou malformações externas

Idem item **2.6.7.1**

2.7.7.2 Análise das anomalias e/ou malformações internas

Idem item **2.6.7.2**

2.7.7.2.1 *Processamento, análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas e contagem dos pontos de ossificação*

Idem item **2.6.7.2.1**

2.7.7.2.2 *Processamento e análise das anomalias e/ou malformações viscerais*

Idem item **2.6.7.2.2**

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas diversas análises foram expressos em média \pm erro padrão da média (média \pm E.P.M.) de cada grupo experimental. Para comparação dos valores médios entre os grupos de massa corporal, ingestão de água, consumo de ração, performance reprodutiva materna e pontos de ossificação, foi utilizado o teste “t” de Student (não pareado). Para a comparação do percentual de PIP, AIP e GIP, frequência e percentual de malformações ou de anomalias fetais aplicou-se o Teste Exato de Fisher. As análises estatísticas foram realizadas no software InStat GraphPad[®] e os gráficos foram construídos através do software GraphPad Prism[®] (versão 5.03). Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXPERIMENTO I - EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO DE PRÉ-IMPLANTAÇÃO

3.1.1 Avaliação da toxicidade aguda nas progenitoras EI

No presente estudo, o tratamento com EHEEu, na dose de 500 mg/kg, no período de pré-implantação (d0-d5) não provocou sinais clínicos de toxicidade aguda em ratas Wistar, como diarreia, piloereção, estresse, agitação, apatia, tremores e sangramento. Além disso, não houve registro de óbito. O mesmo resultado foi encontrado no grupo controle (EIGI).

Segundo Khera (1987), a toxicidade materna é definida como uma alteração, podendo ser transitória ou permanente na fisiologia materna, sendo que a mesma possui potencial para causar efeitos adversos nos descendentes durante o desenvolvimento embrionário ou pós-natal, além de está intimamente associada com malformações características de cada espécie. Contudo, nota-se que os parâmetros relacionados com a toxicidade aguda das progenitoras não foram alterados com a administração do EHEEu.

3.1.2 Avaliação do desenvolvimento ponderal das progenitoras EI

A administração do EHEEu, na dose de 500 mg/kg não interferiu no desenvolvimento ponderal das ratas do grupo tratado (EIGII), pois não foram observadas alterações significativas em relação ao grupo controle (EIGI). O ganho de massa corporal aumentou progressivamente durante (d0-d5) e após o tratamento (d6-d20) em ambos os grupos (Figura 8).

De acordo com Grance (2007) o acompanhamento da massa corporal é um importante indicador para a avaliação de toxicidade de uma determinada substância. Nesse estudo, o tratamento com o EHEEu (500 mg/kg) não afetou a massa corporal das ratas. Além de que esses dados corroboram com a avaliação da toxicidade subcrônica avaliada neste trabalho (capítulo 1), sendo que também não foram observados sinais de toxicidade sistêmica nos animais (machos e fêmeas) tratados com EHEEu, (500 mg/kg), por 21 dias consecutivos.

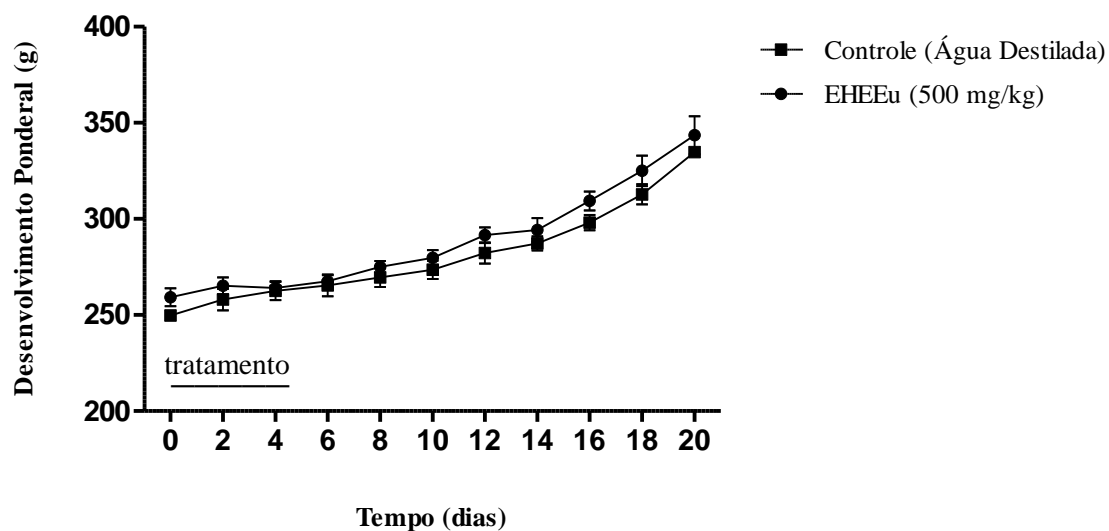


Figura 8 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pré-implantação (d0-d5), e após o tratamento (d6-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

3.1.3 Avaliação do consumo de água e ração das progenitoras EI

O tratamento com EHEEu (500 mg/kg) não alterou a ingestão de água entre os grupos tratado (EIGII) e controle (EIGI), tanto no período de tratamento (d0-d5) quanto no período considerado após o tratamento (d6-d20) (Figura 9).

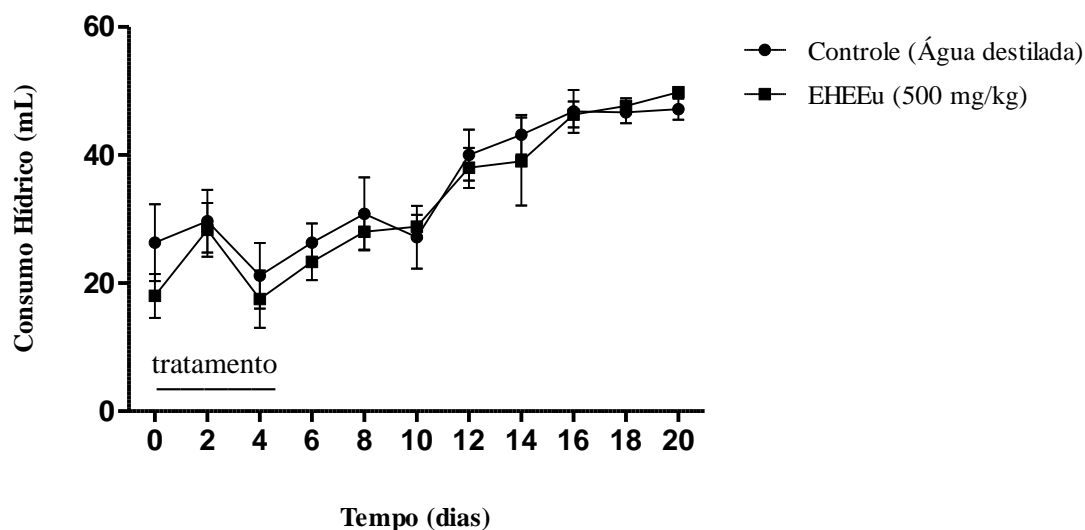


Figura 9 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o consumo hídrico (mL) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pré-implantação (d0-d5), e após o tratamento (d6-d20). No grupo controle foi administrada

água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * p <0.05 comparado ao grupo controle.

No que diz respeito ao consumo de ração, observou-se que tanto as ratas do grupo tratado com o EHHEu (500 mg/kg) (EIGII), como as do grupo controle (EIGI) não tiveram seu consumo afetado, não havendo dessa forma, alteração significativa (p <0.05) entre os grupos, durante e após o período de tratamento, d0-d5 e d6-d20, respectivamente (Figura 10).

Segundo Costa-Silva (2006) a diminuição do consumo de ração é considerado como um sinal de toxicidade materna. Neste estudo, o tratamento com o EHHEu não interferiu no consumo de ração, assim como no consumo hídrico das progenitoras. Assim, levando em consideração todos os sinais clínicos de toxicidade materna analisados (desenvolvimento ponderal, consumo hídrico, consumo de ração, diarreia, piloereção, estresse, agitação, tremores e sangramento) supõe-se que o tratamento com o EHHEu não é tóxico para as mães tratadas durante o período de pré-implantação do blastocisto, pois não foram encontradas quaisquer alterações em tais parâmetros.

Vale ressaltar que Politi et al. (2009) ao analisarem a toxicidade aguda em camundongos, através da administração oral do extrato obtido por decocção 20% (m/v) de *E. uchi*, nas doses de 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg, relataram que em seus resultados não foram observados sinais de toxicidade sistêmica, mortes e alterações fisiológicas ou comportamentais em nenhum dos animais. Dessa forma, os autores classificaram o extrato das cascas de *E. uchi* como pouco tóxico, pois segundo Larini (1987), os agentes tóxicos administrados via oral podem ser classificados de quatro maneiras, levando em consideração sua DL_{50} : extremamente tóxicos (DL_{50} igual ou inferior a 25 mg/kg), altamente tóxicos (DL_{50} entre 100 e 500 mg/kg), mediamente tóxicos (DL_{50} entre 500 e 2000 mg/kg) e pouco tóxicos (DL_{50} acima de 2000 mg/kg).

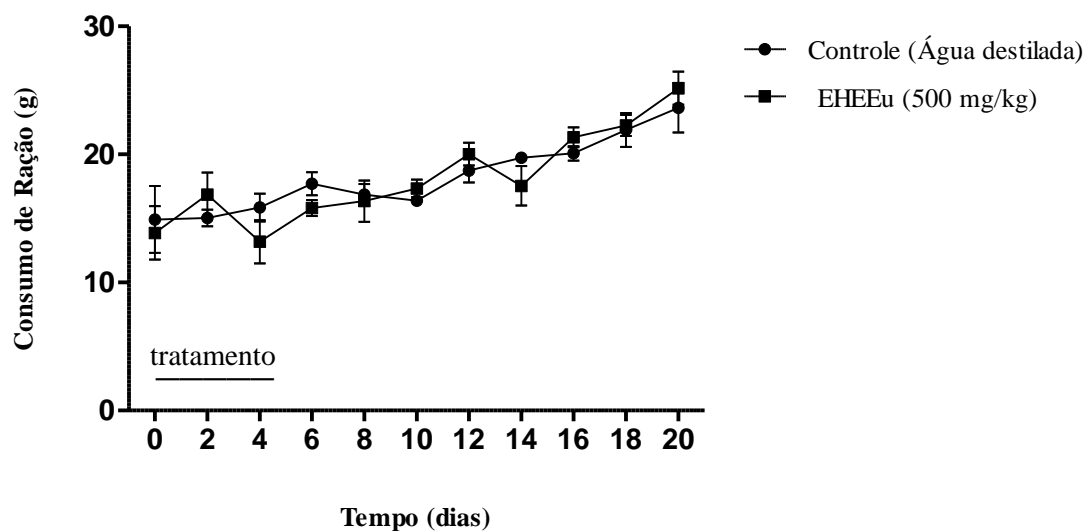


Figura 10 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o consumo de ração (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pré-implantação (d0-d5), e após o tratamento (d6-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

3.1.4 Performance reprodutiva materna EI

A performance reprodutiva materna foi avaliada após as ratas tanto do grupo controle (EIGI) quanto do grupo tratado (EIGII) terem passado pela laparotomia, no 21º dia de gestação. Diversos parâmetros foram analisados, tal como o nº de corpos lúteos, implantações, fetos vivos, perdas pré-implantação, perdas pós-implantação e índice de reabsorção, onde não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos. Da mesma forma, também não foi encontrado diferença nos grupos entre o índice de parto, índice de nascimento, peso fetal, peso placentário e índice placentário (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre a performance reprodutiva materna de ratas prenhas tratadas durante o período de pré-implantação (d0 – d5).

	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Ratas acasaladas (n)	6	6
† durante o tratamento (n)	0	0
Corpos lúteos (n)	10.00 ± 0.51	10.66 ± 0.33
Implantações (n)	8.50 ± 0.84	8.66 ± 1.17
Fetos vivos (n)	7.83 ± 0.65	8.16 ± 1.35
Perdas Pré-implantação (%)	15.25 ± 6.19	18.05 ± 11.4
Perdas Pós-implantação (%)	5.74 ± 2.65	8.33 ± 4.01
Índice de Reabsorção (%)	5.74 ± 2.65	8.33 ± 4.01
Índice de Parto (%)	100 ± 0.00	100 ± 0.00
Índice de Nascimento (%)	100 ± 0.00	100 ± 0.00
Peso Fetal (g)	5.42 ± 0.05	5.29 ± 0.04
Peso Placentário (g)	0.54 ± 0.01	0.53 ± 0.01
Índice Placentário	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média ± E.P.M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

Sadler (2010) afirma que após a oocitação, as células granulosas remanescentes na parede do folículo roto, assim como, as células da teca interna são nutridas pelo vaso circundante. Sob a influência do hormônio luteinizante (LH), tais células desenvolvem um pigmento amarelado, transformando-se em células luteínicas, que por sua vez, formam o corpo lúteo, responsável por secretar estrógenos e progesterona, levando a mucosa uterina a entrar no estágio progestacional ou secretório, num processo de preparação para implantação ou nidação do embrião. Neste estudo, o EHEEu não alterou o número de corpos lúteos das progenitoras, não afetando o processo de implantação do embrião no útero.

Segundo Lourenço et al. (2009), a interpretação das alterações nas taxas reprodutivas pode identificar o período no qual os efeitos tóxicos reprodutivos se estabeleceram. Assim, observou-se que o tratamento com o EHEEu não afetou as taxas de perdas pré-implantação, perdas pós-implantação e reabsorção, assim como o número de implantações e de fetos vivos. Dessa forma, os dados demonstram que o EHEEu não apresentou efeito embrioletal.

Vale ressaltar que o EHEEu não alterou o desenvolvimento intra-uterino dos fetos, pois o peso fetal, peso placentário e índice placentário não foram afetados. Além disso, o

crescimento fetal é diretamente influenciado positivamente ou negativamente pelo estado nutricional materno (DIETZ et al., 2009), sendo que neste estudo as progenitoras não tiveram o seu desenvolvimento ponderal alterado. Assim, a administração do EHEEu, na dose de 500 mg/kg, durante o período de pré-implantação do blastocisto (d0-d5) não foi capaz de alterar a performance reprodutiva materna de ratas Wistar.

3.1.5 Embriofetotoxicidade EI

A maioria dos RNs das ratas tanto do grupo tratado com o EHEEu, na dose de 500 mg/kg, quanto do grupo controle apresentou peso adequado para a idade de prenhez (AIP). Apesar de o grupo tratado ter apresentado um número maior de RNs pequenos para a idade de prenhez (PIP) em relação ao grupo controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Os RNs restantes distribuíram-se em grande para a idade de prenhez (GIP), sendo que o grupo controle teve maior número de representantes, contudo, não apresentando também diferença significativa na porcentagem em relação ao grupo tratado (Figura 11).

A embriofetotoxicidade estuda as alterações induzidas durante desenvolvimento, processo que ocorre entre a concepção e o nascimento (BARROS; DAVINO, 2008). Nota-se que no presente estudo, a administração do EHEEu não provocou toxicidade fetal. Além de que um dos fatores que poderiam influenciar diretamente tal resultado seria a toxicidade materna, contudo, esse parâmetro não foi afetado.

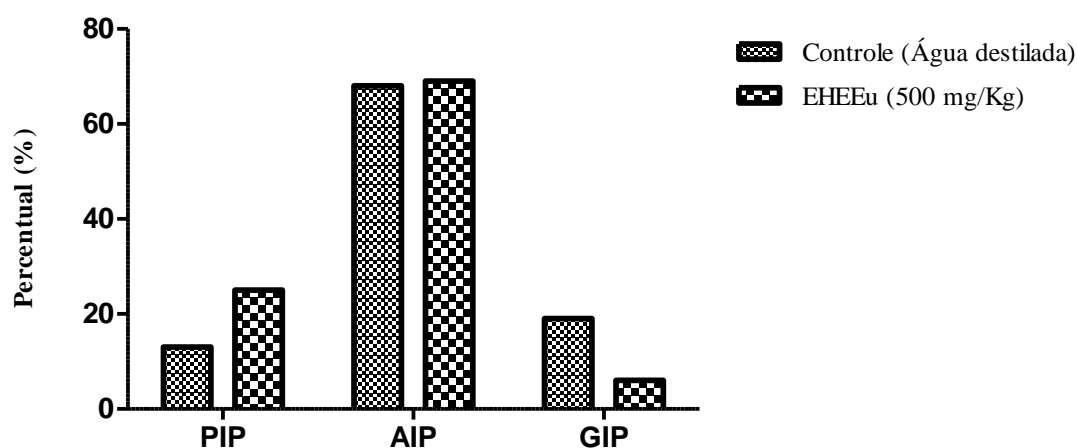


Figura 11 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre recém-nascidos de progenitoras, tratadas durante o período de pré-implantação (d0-d5). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). **PIP**: Pequeno para Idade de Prenhez; **AIP**: Adequado para Idade de Prenhez; **GIP**: Grande para Idade de Prenhez. Os dados representam a média \pm E.P.M. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

3.1.6 Teratogenicidade EI

3.1.6.1 Análise das anomalias e/ou malformações externas e internas (esqueléticas e viscerais) EI

Na análise da teratogenicidade, o EHHEu (500 mg/kg) não causou nenhum tipo de malformações ou anomalias externas, assim como, malformações ou anomalias internas (esqueléticas e viscerais). Vale ressaltar, que esse resultado foi observado ao analisar tanto os RN's como as ninhadas afetadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre a frequência das anomalias e malformações externas e internas (esqueléticas e viscerais) em recém-nascidos e ninhadas de ratas tratadas durante o período de pré-implantação (d0 – d6).

	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Malformações externas		
Recém-nascidos afetados	0/47	0/49
Ninhadas afetadas	0/6	0/6
Anomalias Externas		
Recém-nascidos afetados	0/47	0/49
Ninhadas afetadas	0/6	0/6
Malformações Esqueléticas		
Recém-nascidos afetados	0/23	0/23
Ninhadas afetadas	0/6	0/6
Anomalias Esqueléticas		
Recém-nascidos afetados	0/23	1/23
Ninhadas afetadas	0/6	1/6
Malformações viscerais		
Recém-nascidos afetados	0/24	0/26
Ninhadas afetadas	0/6	0/6
Anomalias Viscerais		
Recém-nascidos afetados	1/24	0/26
Ninhadas afetadas	1/6	0/6

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média \pm E.P.M. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher $*p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

De acordo com Calliari-Martim et al. (2001), a exposição das progenitoras a agentes químicos, durante o período de gestação pode, dependendo de fatores inerentes ao organismo materno, à funcionalidade placentária ou a uma ação direta no próprio organismo embrionário resultar em diversas alterações no desenvolvimento do conceito, podendo ocasionar sua morte, além de malformações ou anomalias ao nascer ou ainda prejuízo no desenvolvimento físico e/ou comportamental do recém-nascido. Contudo, outro fator que se deve levar em consideração, diz respeito aos períodos críticos do desenvolvimento, pois o estágio do desenvolvimento do embrião durante o qual um determinado agente, tal como uma droga ou vírus, está presente, determina a susceptibilidade a um teratogêno. Sendo que o período mais crítico do desenvolvimento é quando a divisão e diferenciação celular e a morfogênese estão em seu ponto máximo (MOORE; PERSAUD, 2008).

No que diz respeito às malformações, o período de pré-implantação em mamíferos tem sido considerado como um período dito como “tudo ou nada”. Dessa forma, a exposição das progenitoras a agentes químicos pode causar morte embrionária, ou simplesmente não interferir no desenvolvimento normal do embrião (WILSON, 1977). Neste estudo não foram evidenciadas malformações nos filhotes analisados.

Quanto à análise diferencial das anomalias internas (esqueléticas e viscerais), esta também não foi significativa ($p < 0.05$) entre os grupos (Tabela 3 e Figura 12). Assim, o tratamento com o EHHEu (500 mg/kg) não induziu efeito teratogênico nos filhotes de ratas tratadas durante o período de pré-implantação do blastocisto.

Tabela 3 - Efeito do tratamento por via oral com EHHEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o percentual das anomalias internas (esqueléticas e viscerais) em recém-nascidos e ninhadas de ratas tratadas durante o período de pré-implantação (d0 – d6).

	CONTROLE	EHHEu 500 mg/kg
Anomalia esquelética (%)		
Esternóbrio rudimentar	0,0	4,34
Anomalia visceral (%)		
Hiperplasia do fígado	4,16	0,0

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média \pm E.P.M. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher. $*p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

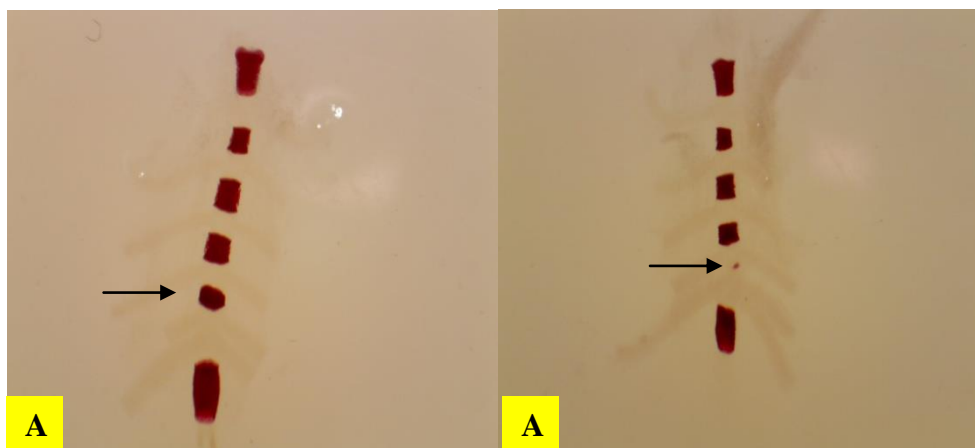


Figura 12 – Anomalia Esquelética (5° esternébrio rudimentar) (EIGI). (A) 5° Esternébrio Normal (EIGI). (B) 5° Esternébrio Rudimentar (EIGII).

Fonte do autor.

3.1.6.2 Contagem dos pontos de ossificação EI

O tratamento com o EHEEu, na dose de 500 mg/kg, quando comparado ao grupo controle, não foi capaz de interferir na ossificação das vértebras cervicais, falanges anteriores, metacarpos, esternébrios, metatarsos, falanges posteriores e vértebras caudais dos RNs expostos no período de pré-implantação. A contagem total dos pontos de ossificação no EIGI e EIGII foi em média de 33,63 e 33,60, respectivamente, sendo que não demonstraram quaisquer alterações significativas entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre os pontos de ossificação em recém-nascidos de ratas tratadas durante o período de pré-implantação (d0 – d6).

	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Vértebras cervicais	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
Esternébrios	6.00 ± 0.00	5.95 ± 0.04
Falanges anteriores	5.00 ± 0.00	4.82 ± 0.12
Metacarpos	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
Falanges posteriores	4.00 ± 0.00	3.86 ± 0.07
Metatarsos	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
Vértebras caudais	4.63 ± 0.21	5.13 ± 0.22
Ossificação Total	33,63 ± 0.21	33,60 ± 0.34

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média ± E.P.M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

Todos os ossos são formados pela substituição de tecido conjuntivo derivado do mesênquima com osteocisto. O conhecimento do processo básico da ossificação do esqueleto humano é largamente derivado de estudos durante os estágios de desenvolvimento pós-natal. Contudo, em ratos, um número de fatores fisiológicos gerais, certamente pode influenciar a taxa de ossificação fetal. Assim, como se poderia esperar, a ossificação do esqueleto fetal está intimamente ligada à taxa global de crescimento fetal (CARNEY; KIMMEL, 2007).

Um dos parâmetros que afetam o crescimento fetal é a toxidade materna, pois a mesma pode interferir diretamente no peso fetal. Contudo para Aliverti et al. (1979), o peso fetal não é parâmetro conclusivo em estudos de desenvolvimento porque pode variar dependendo do tamanho da ninhada. Por tal motivo, os centros de ossificação foram analisados no presente estudo, funcionando como parâmetro adicional para avaliar o desenvolvimento fetal. Neste estudo, o crescimento fetal não foi alterado com o EHEEu, corroborado assim, com a não interferência nos pontos de ossificação dos mesmos.

3.2 EXPERIMENTO II - EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO PÓS-IMPLANTAÇÃO

3.2.1 Avaliação da toxidade aguda nas progenitoras EII

Assim como no período de pré-implantação, observou-se que o tratamento com EHEEu, na dose de 500 mg/kg, administrado no período pós-implantação (organogênese) (d6-d15) não foi capaz de provocar sinais clínicos de toxidade aguda em ratas (diarréia, piloereção, estresse, agitação, apatia, tremores e sangramento), assim como, não provocou nenhum óbito durante a fase experimental. Como não foram observados sinais clínicos de toxidade materna em nenhum dos grupos analisados (EIIGI e EIIGII), indica-se a sua ausência neste período de desenvolvimento.

Calliari-Martin et al. (2001) relatam que a verificação da ocorrência de toxicidade materna após a administração de alguma substância se dá através da parâmetros de observação direta tal como alteração da pelagem, sialorréia, diarréia, apatia, agressividade, perda de comportamento de autolimpeza, assim como através de parâmetros de avaliação indireta como ganho de massa corporal, ingestão de água e de ração, durante o período gestacional. No que diz respeito à observação direta, esta não foi alterada com a administração do EHEEu.

3.2.2 Avaliação do desenvolvimento ponderal das progenitoras EII

A administração do EHEEu (500 mg/kg), durante o período de tratamento (d6-d15), não foi capaz de alterar o desenvolvimento ponderal das ratas quando comparado ao grupo controle até o d12. Contudo, observou-se uma diferença ($p < 0.05$) entre os grupos no d14. Apesar da diferença de massa corporal no referido dia, as ratas do grupo tratado ganharam adequadamente massa corpórea no fim do tratamento (d15), progredindo assim, até o final do período gestacional (d20), caracterizado como período de desenvolvimento fetal (Figura 13). De acordo com Müller (2007) monitoramento da massa corporal durante a fase de tratamento provê um índice do estado geral de saúde dos animais experimentais, sendo que essas informações adquiridas podem tornar-se importantes para a interpretação dos efeitos reprodutivos.

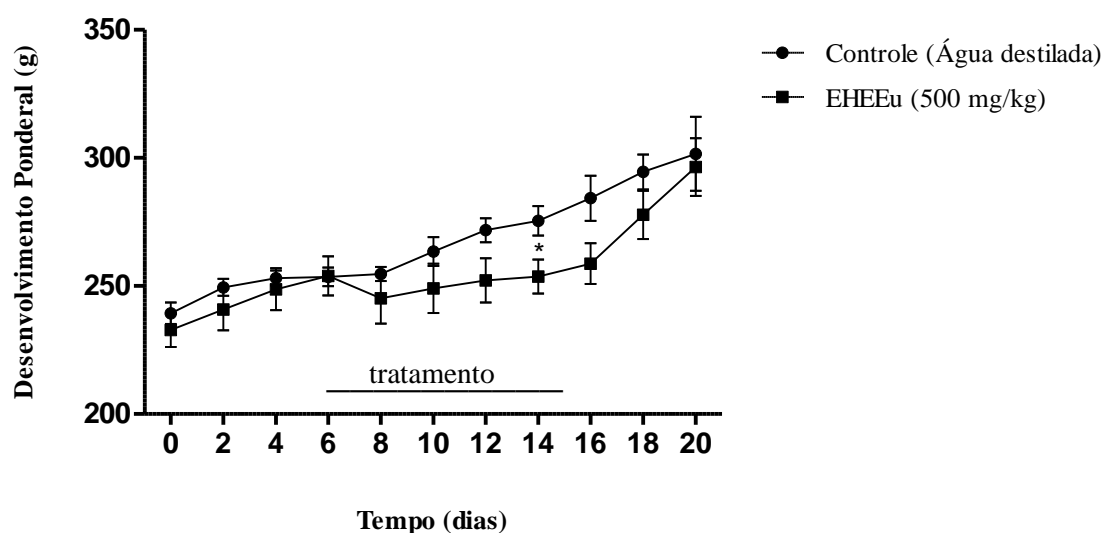


Figura 13 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15), e após o tratamento (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo ($n = 6$ /grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

3.2.3 Avaliação do consumo de água e ração das progenitoras EII

O consumo de água do grupo tratado com o EHEEu (500 mg/kg), não foi alterado durante os dias d6, d8 e d10 de tratamento, quando comparado ao grupo controle. No entanto, os dias d12 e d14 diferiram ($p < 0,05$). Embora tenha sido notada essa diferença estatística na ingestão hídrica (d12-d14), vale ressaltar que tal diferença só ocorreu devido as ratas do grupo

controle terem ingerido mais água durante esse mesmo período. É possível verificar que as ratas do grupo tratado obtiveram um aumento progressivo em sua ingestão hídrica, que variou do d8-20 de prenhez (Figura 14). Assim, infere-se que o EHEEu não foi capaz de alterar a ingestão hídrica das ratas expostas durante o período de organogênese.

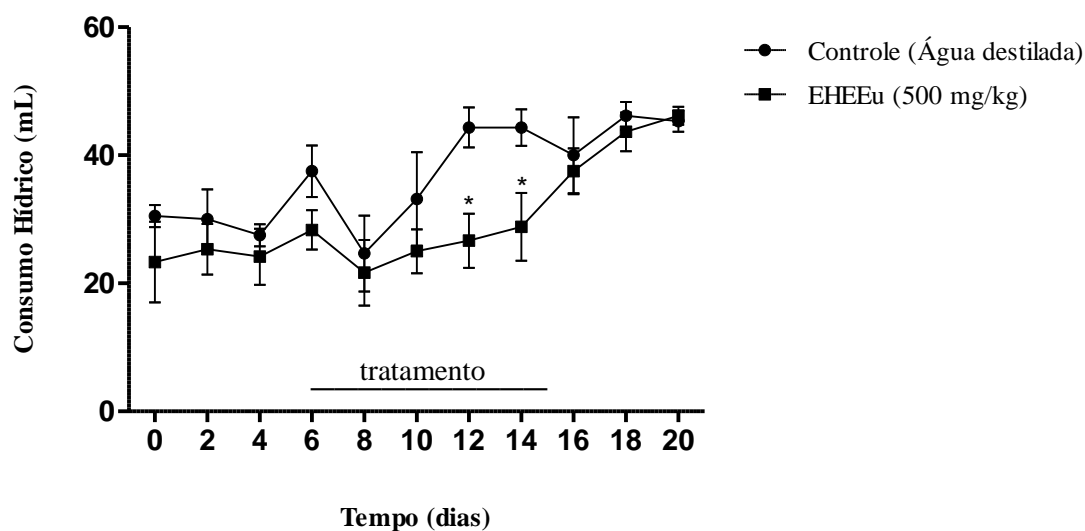


Figura 14 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o consumo hídrico (mL) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15), e após o tratamento (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média ± E. P. M. Foi aplicado o teste "t" de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

O EHEEu, na dose administrada no período de pós-implantação não foi capaz de interferir na ingestão de ração quando comparado ao grupo controle. Embora tenha sido detectado um consumo menor do grupo tratado em relação ao grupo controle, nos dias d14-d16 de prenhez, essas diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 15).

Segundo Mello (2007) no que se refere aos estudos de toxicidade pré-natal a toxicidade materna é confirmada por avaliações que podem incluir vários parâmetros, tais como redução do ganho de peso corpóreo, ocorrência de óbitos durante o período de tratamento, redução do consumo de água e/ou ração, além do aparecimento de sinais clínicos e alterações no peso e/ou morfologia dos diversos órgãos. Apesar da diminuição do peso corpóreo das ratas no d14 de tratamento, evidenciando possível toxicidade materna nesse dia, vale ressaltar que não foi registrado nenhum óbito, redução do consumo de água e ração durante o período de tratamento com o EHEEu.

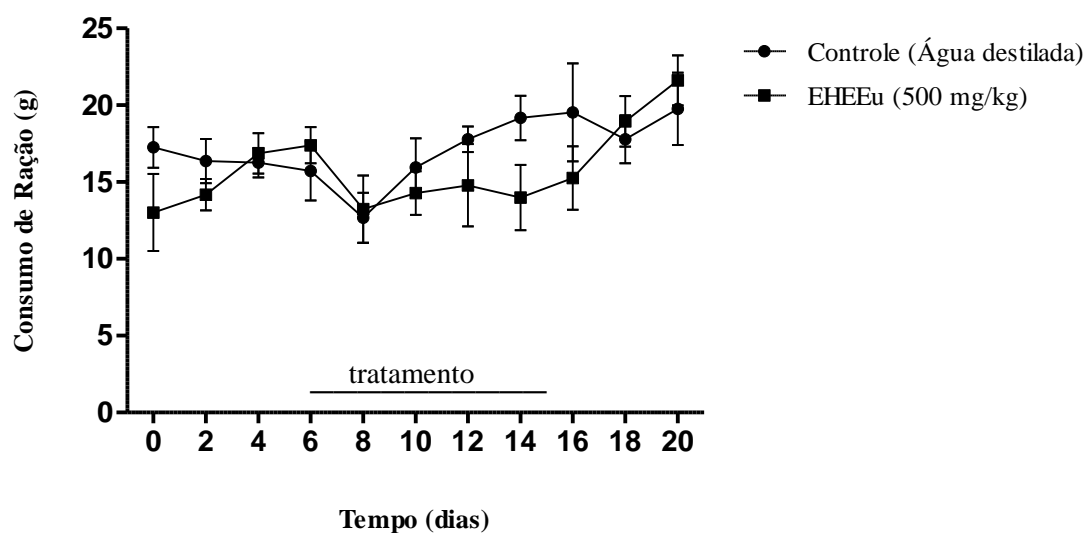


Figura 15 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o consumo de ração (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15), e após o tratamento (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * p <0.05 comparado ao grupo controle.

3.2.4 Performance reprodutiva materna EII

A exposição das ratas ao EHEEu, no período que variou do d6-d15 de prenhez com 500 mg/kg não afetou de forma estatisticamente significativa as seguintes variáveis: nº de corpos lúteos, implantações, fetos vivos, perdas pré-implantação, índice de parto, índice de nascimento, peso fetal, peso placentário e índice placentário. No entanto, o EHEEu demonstrou ter efeito (p <0,05) sobre as perdas pós-implantação e índice de reabsorção dessas ratas tratadas durante o período de pós-implantação do blastocisto no útero desses animais (Tabela 5).

No que diz respeito taxa de perdas pré-implantação, esta constitui a relação entre o número de oócitos liberados e aqueles que depois de fecundados não conseguiram ser implantados no útero (ALMEIDA; LEMÔNICA, 2000). Neste estudo, o número de corpos lúteos e a taxa de perda pré-implantação não foi afetado com a administração do EHEEu.

Segundo Paria et al. (2000) o período de implantação é processo pelo qual o embrião alcança o contato físico e fisiológico íntimo com o endométrio materno para o estabelecimento da gestação, ocorrendo assim, interação entre o blastocisto ativado e o epitélio uterino para iniciar a implantação. Contudo, apesar de haver variação neste processo entre as espécies, certos eventos básicos são similares. No presente estudo, o número de implantações não mostrou diferença significativa entre os grupos tratado e controle,

indicando, provavelmente que o tratamento com o EHEEu não afetou o processo de implantação dos blastocistos.

Tabela 5 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre a performance reprodutiva materna de ratas prenhas tratadas durante o período de pós-implantação (d6 – d15).

	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Ratas acasaladas (n)	6	6
† durante o tratamento (n)	0	0
Corpos lúteos (n)	11.50 ± 1.47	9.50 ± 0.42
Implantações (n)	8.83 ± 1.19	8.33 ± 0.71
Fetos vivos (n)	8.83 ± 1.19	7.00 ± 0.89
Perdas Pré-implantação (%)	21.21 ± 10.07	12.10 ± 7.13
Perdas Pós-implantação (%)	1.85 ± 1.85	16.52 ± 6.16*
Índice de Reabsorção (%)	1.85 ± 1.85	14.67 ± 5.38*
Índice de Parto (%)	100 ± 0.00	100 ± 0.00
Índice de Nascimento (%)	100 ± 0.00	100 ± 0.00
Peso Fetal (g)	4.82 ± 0.06	4.97 ± 0.05
Peso Placentário (g)	0.50 ± 0.01	0.51 ± 0.01
Índice Placentário	0.10 ± 0.00	0.12 ± 0.01

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média ± E.P.M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 6/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

Segundo Müller (2007) as perdas pós-implantes representam o prejuízo reprodutivo total provocado no período de prenhez. Tal parâmetro é representado tanto pelo aumento do índice reabsorção quanto pela diminuição do índice de parturição e também pelos filhotes natimortos. Contudo, neste estudo, apesar do aumento significativo das perdas pós-implantação com conseqüente aumento de reabsorções nas ratas do grupo tratado, observou-se que o índice de parto não diferiu ($p < 0,05$).

Nota-se que a mortalidade materna é um sinal de toxicidade, contudo existem outras variáveis que podem ser usadas como indicativos de efeitos adversos, como a massa corporal durante o tratamento, dados da prenhez e sinais clínicos de toxicidade (EPA, 1991; EPA, 1996). Assim, a ausência da toxicidade materna do EHEEu, na dose testada é demonstrada pelo ganho de massa corporal das progenitoras expostas, ausência de óbitos, além da não interferência nos resultados referente aos parâmetros reprodutivos.

3.2.5 Embriofetotoxicidade EII

O tratamento das ratas com o EHEEu, não foi capaz de interferir no tamanho dos recém-nascidos (PIP, AIP e GIP), pois não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle. Sendo que a maioria dos RNs tanto do grupo tratado com o EHEEu quanto do grupo controle apresentou peso adequado para a idade de prenhez (AIP). Houve um número de representantes equivalente de RNs PIP entre ambos os grupos. Contudo, os recém-nascidos restantes distribuíram-se em grande para a idade de prenhez (GIP), onde o grupo tratado com EHEEu teve maior número de indivíduos, sem diferenças ($p < 0,05$) (Figura 16).

Um critério indicativo de embriofetotoxicidade é avaliar o percentual de RNs que nasceram pequenos (PIP), grandes (GIP) ou adequados (AIP) a idade de prenhez (CALDERON, 1988). Vale ressaltar, apesar da evidência quanto a diferença da massa corporal materna no (d14) (Figura 14), estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, não houve toxicidade fetal, pois o crescimento dos RNs não foi afetado. Assim, o EHEEu (500 mg/kg) não foi capaz causar embriofetotoxicidade nos recém-nascido de ratas prenhas tratadas durante o período de organogênese.

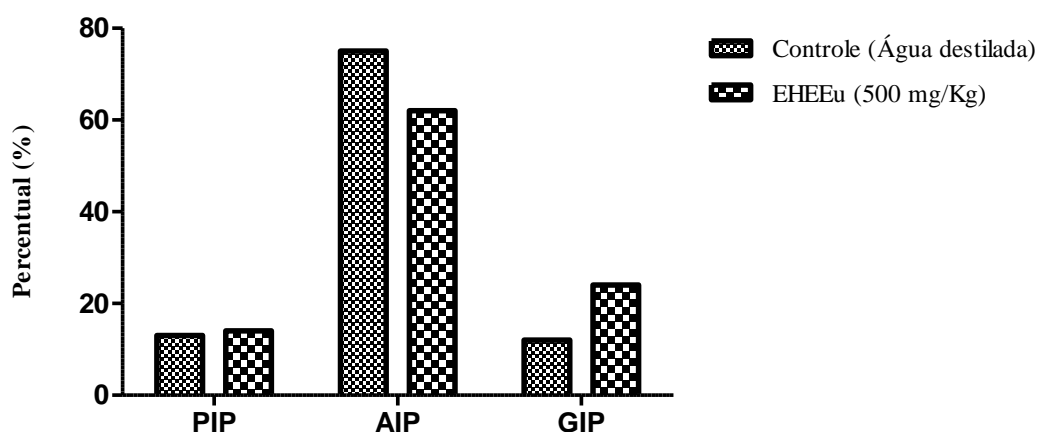


Figura 16 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre recém-nascidos de progenitoras, tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). **PIP**: Pequeno para Idade de Prenhez; **AIP**: Adequado para Idade de Prenhez; **GIP**: Grande para Idade de Prenhez. Os dados representam a média \pm E.P.M. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher. $*p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

3.2.6 Teratogenicidade EII

Assim como no período de pré-implantação, o tratamento com o EHEEu (500 mg/kg) no período de pós-implantação não foi capaz de causar teratogenicidade (malformações e anomalias externas e internas), pois não houve diferença estatística significativa ao ser comparado com o grupo controle, tanto em ninhadas como RNs afetados (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre a frequência das anomalias e malformações externas e internas (esqueléticas e viscerais) em recém-nascidos e ninhadas de ratas tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15)

	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Malformações externas		
Recém-nascidos afetados	0/51	0/42
Ninhadas afetadas	0/6	0/6
Anomalias Externas		
Recém-nascidos afetados	0/51	0/42
Ninhadas afetadas	0/6	0/6
Malformações Esqueléticas		
Recém-nascidos afetados	0/25	0/20
Ninhadas afetadas	0/6	0/6
Anomalias Esqueléticas		
Recém-nascidos afetados	0/25	0/20
Ninhadas afetadas	0/6	0/6
Malformações viscerais		
Recém-nascidos afetados	1/26	1/22
Ninhadas afetadas	1/6	1/6
Anomalias Viscerais		
Recém-nascidos afetados	3/26	1/22
Ninhadas afetadas	2/6	1/6

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média \pm E.P.M. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

Ao fazer a análise diferencial das malformações e anomalias internas (viscerais), nota-se que não foram observadas alterações significativas entre os grupos quanto ausência de testículo (Figura 17), comunicação intra-ventricular, hidrocefalia, hidronefrose e hipoplasia renal. Tais dados foram menos expressivos no grupo tratado com o EHEEu, confirmado pela ausência de comunicação intra-ventricular, hidrocefalia e hipoplasia renal (Tabela 7). Assim,

os resultados deste trabalho sugerem que o tratamento com o EHEEu não provocou efeitos teratogênicos, não interferindo na formação dos órgãos rudimentares dos filhotes de ratas tratadas na fase de organogênese.

Tabela 7 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o percentual das anomalias e malformações externas e internas (esqueléticas e viscerais) em recém-nascidos e ninhadas de ratas tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15).

	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Malformações viscerais (%)		
Ausência de testículo	0,0	4,54
Comunicação intra-ventricular	3,84	0,0
Anomalias viscerais (%)		
Hidrocefalia	7,69	0,0
Hidronefrose	0,0	4,54
Hipoplasia renal	3,84	0,0

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média \pm E.P.M. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

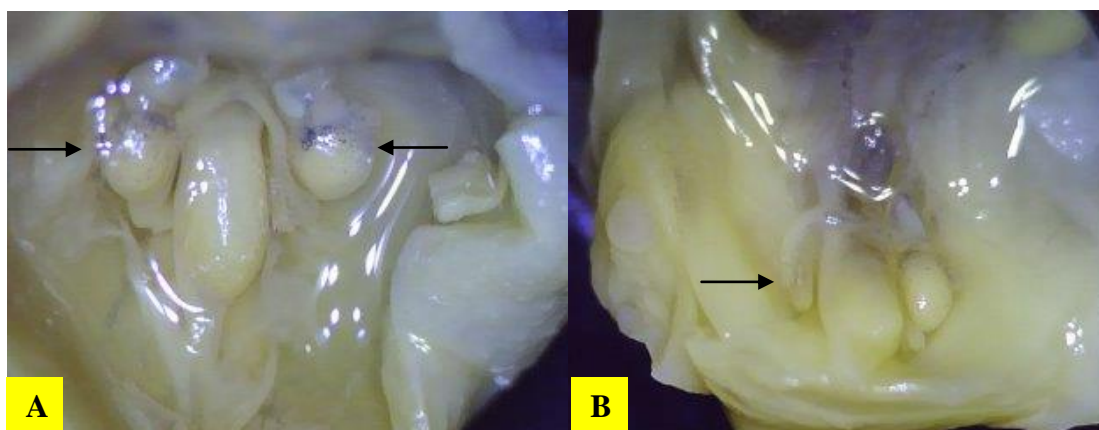


Figura 17. Malformação visceral (ausência de testículo) **A.** Testículos normais (EIIGII) e **B.** Ausência de testículo (EIIGII) (ponta da seta).

3.2.6.1. Contagem dos pontos de ossificação

A contagem dos pontos de ossificação das vértebras cervicais, falanges anteriores, metacarpos, esternóbrios, metatarsos, falanges posteriores e vértebras caudais dos RNs expostos no período de pós-implantação, não foi alterado com a administração do EHEEu (500 mg/kg), pois não evidenciou diferenças significativas em relação ao grupo controle

(Tabela 8). A contagem total dos pontos de ossificação no EIGI e EIGII foi em média de 33.88 e 34.00, respectivamente, sem diferença estatística significativa.

Bernardi (1999) afirma que quanto maior for o período que leva a formação de um determinado sistema, maior será o risco de seu desenvolvimento ser afetado por um determinado agente. Por tal motivo que no teste de teratogenicidade são estudadas as possíveis anomalias ósseas dos animais, pois o período de organogênese do esqueleto é bastante longo. Vale ressaltar que neste estudo foi realizada tanto a análise esquelética quanto a análise da contagem dos pontos de ossificação em dois períodos críticos do desenvolvimento (pré-implantação e organogênese), sendo que nenhum dos parâmetros diferiram significativamente após a administração do EHEEu.

Tabela 8 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre os pontos de ossificação em recém-nascidos de ratas tratadas durante o período de pós-implantação (d6-d15).

	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Vértebras cervicais	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
Esternébrios	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00
Falanges anteriores	5.00 ± 0.00	4.95 ± 0.05
Metacarpos	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
Falanges posteriores	3.95 ± 0.04	4.00 ± 0.00
Metatarsos	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
Vértebras caudais	4.96 ± 0.20	5.00 ± 0.14
Ossificação Total	33.88 ± 0.21	34.00 ± 0.16

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média ± E.P.M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4 CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que a administração oral do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. uchi*, na dose de 500 mg/kg, em ratas Wistar, durante os períodos de pré-implantação e organogênese não provocou toxicidade materna, não alterou a contagem dos pontos de ossificação, não provocou embriofetotoxicidade e teratogenicidade na prole. Quanto ao parâmetro performance reprodutiva materna, este não foi alterado no período pré-implantação, contudo, no período de organogênese aumentou significativamente o número de perdas pós-implantes, com conseqüente aumento, também significativo, do índice de reabsorções.

REFERÊNCIAS

- ALIVERTI, V. *et al.* The extent of fetal occification as an index of delayed developomment in teratogenic studies on the rat. **Teratol**, v. 20, p. 237-242, 1979.
- ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 73, p. 53-60, 2000.
- ABREL, V. G. C.; CORRÊA, G. M.; LAGOS, I. A. S.; SILVA, R. R.; ALCÂNTARA, A. F. C. Pentacyclic triterpenes and steroids from the stem bark of uchi (*Sacoglottis uchi*, Humiriaceae). **Acta Amazonica**, v. 43, p. 525-528, 2013.
- ABREL, H. A.; LAGO, I. A. S.; SOUZA, G. P.; PILÓ-VELOSO, D.; DUARTE, H. A.; ALCÂNTARA, A. F. C. Antioxidant activity of (+)-bergenin—a phytoconstituent isolated from the bark of *Sacoglottis uchi* Huber (Humireaceae). **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 2713 2718, 2008.
- BARBOSA, W. L. R.; TAVARES, I. C. C. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. 1 ed. Belém: UFPA, 2001. v. 01. 20 p.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. Ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p 59-71.
- BENTO, J. F.; NOLETO, G. R.; Petkowicz, C. L. O. Isolation of an arabinogalactan from *Endopleura uchi* bark decoction and its effect on HeLa cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p.871-877, 2014.
- BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 691- 699.
- BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 566-574.
- BLAIR, K.; WRAY, J.; SMITH, A. The liberation of embryonic stem cells. **PLoS Genetics**, vol. 7, p. 1-6, 2011.
- BORGES, J. C. M.; FILHO, H. S. R.; GUILHON, G. M. S. P.; CARVALHO, J. C. T.; SOUSA, P. G. C. Antinociceptive activity of acetylbergenin in mice. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p. 1303-8, 2011.
- CALDERON, I. M. P. **Modelo experimental em ratas para estudo do binômio diabete e gravidez**. 1988. 125f. Dissertação (Bases Gerais de Cirurgia Experimental) – Medicina, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/Botucatu, 1988.
- CALLIARI-MARTIM, M. R.; DIETERICH, S.; BORTOLINI, C. E.; CUNHA, C. T.; LORENCETI, G. Embriotoxicidade da *Artemisia Vulgaris* LINNÉ em ratas. **Revista Médica HSVP**, v. 11, p. 12-17, 2001.

- CARMO, J. C.; PETER, V. M.; GUERRA, M. O. Cronologia do desenvolvimento embrionário e fetal de ratos conforme a datação do início da prenhez. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 26, p. 51-59, 2007.
- CARNEY, E. W.; KIMMEL, C. A. Interpretation of Skeletal Variations for Human Risk Assessment: Delayed Ossification and Wavy Ribs. **Birth Defects Research (Part B)**, v. 80, p. 473-496, 2007.
- COSTA, P. A.; BALLUS, C.A.; TEXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43 p. 1603-1606, 2010.
- COSTA-SILVA, J.H; LYRA, M.M.A.; LIMA, C.R.; ARRUDA, V.M.; ARAÚJO, A.V.; RIBEIRO, A.R.; ARRUDA, A.C.; FRAGA, M.C.C.A.; LAFAYETTE, S.S.L.; WANDERLEY, A. G. Estudo Toxicológico Reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em Ratas Wistar. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, p. 425 – 428, 2006.
- DIETZ, P.M.; CALLAGHAN, W.M.; SMITH, R.; SHARMA, A.J. Low pregnancy weight gain and small for gestational age: a comparison of the association using 3 different measures of small for gestational age. **Am J Obstet Gynecology**, v. 201, p. 1-7, 2009.
- FRITZ, H.; GIESE, K. Evaluation of the Teratogenic Potential of Chemicals in the Rat. **Pharmacol**, v. 40, p. 1 - 28, 1990.
- GRANCE, S. R. M. **Efeitos do extrato hidroetanólico de Baccharis trimera em ratas prenhes e seus conceptos**. 2007. 81 f. Dissertação (Programa de Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.
- HANSEN, J.M.; HARRIS, C. Redox control offeratogenesis. **Reproductive toxicology**, v.35, p.165-179, 2013.
- KHERA, K.S. Maternal taxicity of drugs and metabolic disorders: a possible etiologia factor in the metabolic disorders: a possible etiologia factor in the intrauterine death and congenital malformation: a critique on human data. **Critical Reviews in Toxicology**, v.17, p.345-375, 1987.
- LARINI L. **Toxicologia**. Ed. 1, São Paulo: Manole, 1987. p 301.
- LOURENÇO, A. C. S.; MIGUEL, L. K.; GUARIDO, K. L.; SENSIATE, L. A.; SALLES, M. J. S. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embriofetal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, p.407-413, 2009.
- MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. P.; MARINHO, H. A.; FERREIRA, A. G. Identificação de bergenina e carotenoides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, *Humiraceae*). **Acta Amazonica**, v. 37, p. 447-450, 2007.
- MELLO, M. S. C. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifetil hidróxido de estanho (tpth) em camundongos**. 2007. 154 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em

Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.

MARX, F., ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. Studies of edible Amazonian plants. Part 5: Chemical characterization of Amazonian *Endopleura uchi* fruits. **European Food Research and Technology** v.214, p.331-334, 2002.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista brasileira de farmacognosia**, vol.11, p. 21-35, 2001.

MOORE, K.L; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Básica**. 8. ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2008. p 536.

MÜLLER, J. C. **Toxicidade reprodutiva da *Morinda citrifolia* Linn.** 2007. 103 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NEVES, L. C.; CAMPOS, A. J.; BENEDETTE, R. M.; TOSIN, J. M.; CHAGAS, E. A. Characterization of the antioxidant capacity of natives fruits from the brazilian amazon region. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, p. 1165-1173, 2012.

NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; DA SILVA, S. L.; NUNOMURA, S. M. Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1060-1064, 2009.

PARIA, B.C.; LIM, H.; DAS, S.K.; REESE, J.; DEY, S.K. Molecular signaling in uterine receptinty for inplantation. **Semin. Cell & Developmental Biology**, v. 11, p.67-76, 2000.

POLITI, F. A. S.; MELLO, J. C. P.; MIGLIATO, K. F.; NEPOMUCENO, A. L. A.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p. 2757-2768, 2011.

POLITI, F. A. S.; MOREIRA, R. R. D.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. Testes preliminares de motilidade intestinal e toxicidade oral aguda com extrato de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) em camundongos. **Revista Pan-Amaz Saude**, v.1, p. 187-189, 2010.

POLITI, F. A. S. **Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae).** 2009. 144 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.

RODRIGUES, H. G.; MEIRELES, C. G.; LIMA, J. T. S.; TOLEDO, J. P.; CARDOSO, J. L.; GOMES, S. L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 13, p. 359-366, 2011.

SACHETTI, C. G. **Avaliação toxicológica do óleo-resina de copaíba em ratos: estudo de toxicidade aguda, neurotoxicidade e embriofetotoxicidade.** 2010. 92 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

SADLER, T. W. **Embriologia Médica**, 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 324p. 2010.

SANTOS, E. C. S. **Avaliação do potencial tóxico do extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi* Ducke sobre o sistema reprodutor masculino e órgãos vitais de ratos e sua prole.** 2012. 122 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, 2012.

SCHÜLER-FACCINI, L.; LEITE, J.; SANSEVERINO, M. T. V.; PERES, R. M. Avaliação de teratógenos na população brasileira. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, p. 65-71, 2002.

SILVA, S. L. da; OLIVEIRA, V. G.; YANO, T.; NUNOMURA, R. C. S. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta amazônica**, v. 39, p. 187-191, 2009.

STAMATKIN, C. W.; ROUSSEV, R. G.; STOUT, M.; ABSALON-MEDINA, V.; RAMU, S.; GOODMAN, C.; COULAM, C. B.; GILBERT, R. O.; GODKE, R. A.; BARNEA, A. R. PreImplantation Factor (PIF) correlates with early mammalian embryo development-bovine and murine models. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 1-11, 2011.

STAPLES, R. E; SCHNELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red s method for fetal bone. **Stain technology**, v. 39, p. 61-63, 1964.

TACON, L. A.; FREITAS, L. A. Box-Behnken design to study the bergenin content and antioxidant activity of *Endopleura uchi* bark extracts obtained by dynamic maceration. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 65-71, 2013.

TACON, L. A.; **Estudo da extração e secagem por spray dryer das cascas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. Humiriaceae.** 2012. 108 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

US EPA- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA/630/R 96/009:** Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment Washington, 1996.

US EPA- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidelines for developmental toxicity risk assessment. **Federal Register**, v.56, p.63798-63826, 1991.

WANDERLEY, A. G. Estudo toxicológico reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em ratas wistar. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, p.425-428, 2006.

WILSON, J. D. Current status of toxicology. In: WILSON, J. D.; FRASER. F. C. **Handbook of teratology.** (Ed.), London: Plenum Press, v.1, p.47-74, 1977.

WILSON, J. C. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal. *In*: WILSON, J.C.; WARKANY. **Teratology: principles and techniques**. Chicago: Univ. of Chicago Press, 1965. p. 262-277.

**CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA TOXIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, EM RATAS WISTAR NO
PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO FETAL**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, na progênie de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal, o efeito do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. uchi* (EHEEu) sobre o desenvolvimento geral e sexual da progênie. Ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), isogênicas, foram divididas em dois grupos (n=5/grupo), sendo um grupo tratado e outro controle. O grupo tratado recebeu o EHEEu, na dose de 500 mg/kg durante o período de desenvolvimento fetal (d16-d20 de prenhez), enquanto que o grupo controle recebeu 0,5 mL de água destilada durante o mesmo período. Os resultados da exposição na dose e período relatado, revelaram que o EHEEu não provocou toxicidade aguda nas progenitoras, pois não causou diarreia, piloereção, estresse, agitação, apatia, tremores e sangramento, assim como não provocou alterações no desenvolvimento ponderal, consumo de água e ração, em relação ao grupo controle. Os parâmetros reprodutivos maternos também não foram alterados, tal como tempo de prenhez, índice de nascimento, índice de viabilidade, índice de desmame e tamanho da ninhada. A massa corporal (g) ao nascer, e ao desmame não diferiu significativamente entre os descendentes de ratas expostas ao controle e ao EHEEu. Sendo que o desenvolvimento ponderal dos descendentes também não foi alterado (1, 4, 7 e 19 dia pós natal). Os parâmetros utilizados para a avaliação da atividade motora e avaliação de desenvolvimento geral da prole como período (dias) para o descolamento dos pavilhões auriculares, aparecimento da penugem, erupção dos incisivos, aparecimento de pêlos, abertura dos olhos e razão sexual não foram afetados com a administração do EHEEu. A descida bilateral dos testículos e separação prepucial completa não foi alterada, contudo, o tempo de abertura do canal vaginal e o ciclo estral das descendentes fêmeas foi alterado. Assim, concluiu-se que o EHEEu administrado no período de desenvolvimento fetal não causou toxicidade materna, não alterou os parâmetros reprodutivos maternos, não afetou o desenvolvimento ponderal, as características gerais dos descendentes e a atividade motora, no teste de campo aberto, no entanto, as características sexuais das descendentes fêmeas foram afetadas.

Palavras-chave: ratas Wistar. toxicologia reprodutiva. período fetal. progênie.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate, in the progeny of female rats treated during the period of fetal development, the effect of the extract hydroethanolic extract of the peels of the stem of *E. uchi* (EHEEu) on the general and sexual development of the progeny. Female Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), isogenical, were divided in two groups (n=5/grupo), treated group and control group. The treated group received EHEEu, in the dose of 500 mg/kg during the period of fetal development (pregnancy d16-d20), while the control group received 0,5 mL of water distilled during the same period. The results of the exhibition in the dose and reported period, showed that EHEEu did not provoke acute toxicity in the progenitors, because it did not cause diarrhea, piloerection, stress, agitation, apathy, tremors and bleeding, as well as it didn't provoke alterations in the weighted development, consumption of water and food, in relation to the control group. The maternal reproductive parameters were not also changed, as in the pregnancy period, rate of birth, viability rate, weaning rate and size of the brood. The body mass (g) and the weaning did not differ significantly among the descendants of exposed female rats to the control and EHEEu. And the descendants' weighted development was not also changed (1, 4, 7 and 19 post-born). The parameters used for the evaluation of the locomotion activity and evaluation of general development of the offspring as the period (days) for the displacement of the auricle pavilions, fluff, eruption of the incisors, hair, opening of the eyes and sexual gender were not affected with the administration of EHEEu. The bilateral descent of the testicles and separation preputial completes was not altered, however, the time of opening of the vaginal channel and the estrous cycle of the female descendants was not changed. So, it was concluded that EHEEu administered in the period of fetal development did not cause maternal toxicity, it did not change the maternal reproductive parameters, it did not affect the weighted development, the descendants' general characteristics and the motor activity, in the test of open field, however, the female descendants' sexual characteristics were affected.

Keywords: Female Wistar Rats. Reproductive Toxicology. Fetal Period. Progeny.

1 INTRODUÇÃO

Devido a elevada procura por alternativas naturais, para prevenir e curar enfermidades aumentou o consumo de plantas medicinais tanto em forma de chás como com outras preparações da planta e formas farmacêuticas (HOLLENBACH, 2008). Dados recentes revelam que cerca de 75-80% da população em todo o mundo utilizam plantas medicinais, principalmente nos países em desenvolvimento, isso se deve ao seu fácil acesso, além da crença de que este tipo de terapia não causa efeitos adversos graves (TABASSUM, 2011). Dessa forma, alguns princípios ativos poucos estudados se tornam um verdadeiro perigo para a saúde da população. Para tanto, os estudos relacionados com a toxicidade pré-clínica, além da avaliação da segurança e eficácia dos fitoterápicos se tornam essenciais (HOLLENBACH, 2008).

Segundo Bortolini (2009) o período gestacional pode ser dividido em três estágios, levando-se em consideração a sensibilidade a agentes teratogênicos. O primeiro estágio começa com a fecundação, se estendendo até a implantação do blastocisto. O segundo estágio é chamado de organogênese, caracterizado por intensa proliferação celular, movimento e deslocamento de massa celular e complexos sistemas de interação núcleo/citoplasma e intercelulares. Tal período é o mais suscetível à ação de agentes teratogênicos. O terceiro e último estágio, o período fetal, se distingue pela diferenciação histológica e funcional dos diferentes órgãos e aparelhos, além de um evidente crescimento ponderal do concepto.

Vale ressaltar, que além dos efeitos teratogênicos induzidos *in utero*, onde geralmente são diagnosticados precocemente ainda durante a gestação ou ao nascimento, existe uma grande preocupação com distúrbios que podem se manifestar tardiamente, como alterações comportamentais, distúrbios neurodegenerativos, alterações metabólicas e disfunções reprodutivas (WHO, 2002).

Moore e Persaud (2008) afirmam que o ciclo reprodutivo não consiste apenas na concepção, gravidez e nascimento, mas que tem início com a produção de gametas nos pais (ainda no período pré-natal do organismo parenteral), seguindo pela fertilização e desenvolvimento embriofetal, nascimento e desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual, fase no qual o descendente adulto torna-se capaz de procriar. Dessa forma, algumas substâncias podem causar aumento de morte pós-natal, depois de algumas semanas de nascimento, podendo produzir outros efeitos, que serão visualizados somente após o nascimento, tal como a catarata, que se manifesta somente após o 21º dia de vida (NAROTSKY; KAVLOCK, 1995).

Considerando que a literatura possui escassas evidências sobre o uso seguro de *E. uchi*, o objetivo deste capítulo foi avaliar, na progênie de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal, o efeito do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. uchi* (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento geral e sexual da progênie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A execução dos diversos protocolos experimentais ocorreu no Laboratório de Pesquisa em Fármacos, do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, situado na Rodovia Juscelino Kubitschek, Km-02 - Zerão – Macapá, AP- Brasil.

2.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O pó das cascas do caule de *E. uchi* (464g) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da UFGA, sendo que este material botânico foi coletado na região metropolitana de Belém, Estado do Pará, Brasil em 03 de abril de 2005, em mata de terra firme e a identificação efetuada por botânicos da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), cuja exsicata encontra-se depositada no herbário da referida instituição sob código nº 180611.

2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO BRUTO

O material vegetal seco foi macerado, em solução hidroalcoólica a 75%, na proporção de 1:5 em temperatura ambiente, durante sete (7) dias, sob agitação constante (BARBOSA e TAVARES, 2001). Em seguida, o macerado foi filtrado e concentrado em rotaevaporador (QUIMIS, Modelo Q. 218.2), na temperatura de 40°C até a evaporação completa do solvente. O filtrado concentrado foi submetido à liofilização fornecendo 10.65% de rendimento.

2.3 DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, isogênicos, machos e fêmeas em idade reprodutiva (três meses), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade de Campinas – UNICAMP e do Biotério do Laboratório Central do Amapá (LACEN – AP).

O projeto de dissertação foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá, com o registro CEP – UNIFAP 001A/2012.

2.4 GRUPO EXPERIMENTAL

Neste capítulo, o estudo foi dividido em apenas um ensaio: Ensaio Experimental (Experimento III), onde continha dois grupos: grupo controle (GI) e grupo tratado (GII) (Quadro 1).

Quadro 1 - Grupo experimental para avaliar a performance reprodutiva de *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, fêmeas, tratados com o EHEEu e água destilada.

EXPERIMENTO	GRUPOS
(III) - Período Fetal	<p>EXP. III GI: Ratas prenhes, que receberam por via oral, 0,5 mL de água destilada, no período de desenvolvimento fetal (n = 6);</p> <p>EXP. III GII: Ratas prenhes, que receberam por via oral, uma dose correspondente a 500 mg/kg do EHEEu, no período de desenvolvimento fetal (n = 6);</p>

2.5 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Foi dividida em quatro períodos: de adaptação, de identificação do ciclo estral, de acasalamento e de tratamento.

2.5.1 Período de adaptação

As ratas passaram por um período de adaptação, no Laboratório de Pesquisa em Fármacos durante quinze dias. Permanecendo em estantes ventiladas (Alesco®), em caixas de polipropileno, com capacidade máxima de cinco animais, sob temperatura controlada ($23\pm 2^\circ$ C) e obedecendo a um ciclo claro/escuro (fotoperíodo) de 12 horas (período claro das 7:00 h da manhã as 19:00 h da noite) e receberam água e ração (Labina®) à vontade.

2.5.2 Identificação das fases do ciclo estral das ratas

Após as ratas terem passado pelo período de adaptação, iniciou-se a fase de identificação das fases do ciclo estral por meio de um esfregaço vaginal que ocorria sempre pela manhã (8:00 h), com duração de aproximadamente 20 dias. Os esfregaços eram

realizados com auxílio de uma micropipeta, por meio da lavagem vaginal com 10 µL de solução de cloreto de sódio a 0,9% e posterior avaliação, a fresco, em microscopia óptica (aumento 40x) conforme a metodologia descrita por Marcondes et al. (2002).

O ciclo estral de ratas tem duração média de quatro ou cinco dias e é caracterizado por quatro fases, proestro, estro, metaestro (diestro I) e diestro (diestro II), as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (MARCONDES et al., 2002) (Quadro 2)

Quadro 2 - As quatro fases do ciclo estral de *Rattus norvegicus albinus* (fêmeas), mediante exame de citologia vaginal.

FASE	CARACTERÍSTICAS
Proestro (12 h)	Grande número de células epiteliais nucleadas, algumas células epiteliais queratinizadas (sem núcleo) e ausência total de leucócitos.
Estro (14 h)	Presença de células queratinizadas e ausência total de leucócitos. A ovulação ocorre espontaneamente na metade do ciclo escuro durante esta fase.
Metaestro (21 h)	Inúmeros leucócitos, filamentos de muco e resíduos de células epiteliais queratinizadas.
Diestro (57 h)	Período de repouso em que a mucosa vaginal apresenta-se delgada, com leucócitos e algumas células nucleadas.

2.5.3 Período de Acasalamento

Nesta fase, fêmeas nulíparas foram colocadas em contato com machos adultos na fase escura do ciclo (proestro) para o acasalamento na proporção de duas (2) fêmeas para um (1) macho. Na manhã seguinte, realizaram-se os lavados vaginais. Foi considerada como indicativo de prenhez a presença de espermatozóides, associado ao diagnóstico da fase estro do ciclo estral. Esta fase é considerada como a fase estrogênica máxima, onde são encontradas apenas células queratinizadas. Assim, confirmada a prenhez, convencionou-se esse dia como dia 0 (zero) de prenhez (d0) e as fêmeas foram mantidas em caixas individuais de polipropileno (414 x 344 x 168 mm). Os acasalamentos foram repetidos diariamente até a obtenção do número suficiente de progenitoras de acordo com cada experimento realizado.

2.5.4 Período de Tratamento (d16 – d20)

Neste experimento, fêmeas prenhas (n=5/grupo), tanto do grupo controle (EIIIGI) como do grupo tratado (EIIIGII), foram tratadas uma vez ao dia, via oral (Figura 1), com água destilada (5 mL) e HHEEu (500 mg/Kg) respectivamente, na fase de desenvolvimento fetal, que caracteriza-se pela diferenciação e crescimento tissular, maturação fisiológica dos diferentes sistemas e crescimento ponderal do feto (FRITZ; GIESE, 1990; ROGERS; KALVLOCK, 2001) Desta forma, a duração do tratamento correspondeu do d16 ao d20 de prenhez.



Figura 1 – Tratamento via oral dos animais.
Fonte do autor.

2.6 PARÂMETROS ANALISADOS

2.6.1 Avaliação da toxicidade aguda nas progenitoras

Durante o período de tratamento, as progenitoras foram avaliadas quanto à presença de manifestações de vários sinais de toxicidade aguda, tal como: diarreia, piloereção, estresse, tremores, salivação e sangramento.

2.6.2 Avaliação do desenvolvimento ponderal das progenitoras

No que diz respeito ao ganho de massa das progenitoras, a massa corporal de cada uma foi registrada nos dias d0, d3, d6, d9, d12, d15, d18 e d21 de prenhez, com a utilização de uma balança Gehaka BG 4000, com capacidade de 4200 g e precisão de 0,01 g.

2.6.3 Avaliação do consumo de água e ração das progenitoras

Também foi mensurado o consumo de água e ração durante os mesmos dias de prenhez e condições citados acima. Onde, diariamente, eram disponibilizado 50g de ração e 250 mL de água para cada rata prenha.

2.6.4 Avaliação dos parâmetros reprodutivos das progenitoras

Após o parto as fêmeas permaneceram com os filhotes até o 19º dia pós-natal (19dpn), correspondendo ao período de lactação, quando foram sacrificadas por inalação em câmara de CO₂, sendo descartados juntamente com o lixo hospitalar da Policlínica da Universidade Federal do Amapá, o qual é recolhido por uma empresa privada especializada que possui convênio com a Universidade Federal do Amapá para ser incinerado. As variáveis investigadas foram:

- *MORTALIDADE MATERNA;*
- *TEMPO DE PRENHEZ;*
- *TAMANHO DA NINHADA;*

- *ÍNDICE DE NASCIMENTO (%)* = (nº de filhotes nascido vivos/ nº de filhotes nascidos) x 100;
- *ÍNDICE DE VIABILIDADE (%)* = (nº de filhotes vivos no 4º dia pós-natal / nº de nativos) x 100;
- *ÍNDICE DE DESMAME (%)* = (nº de filhotes vivos no desmame/ nº de nascidos vivos) x 100.

2.6.5 Avaliação da progênie

A 1ª geração de descendentes referente a cada ninhada, tanto do grupo controle como do grupo tratado foi avaliada para as variáveis de desenvolvimento geral:

2.6.5.1 Avaliação do desenvolvimento ponderal da progênie

O desenvolvimento ponderal foi avaliado com a verificação da massa dos descendentes nos dias 1dpn, 7dpn, 14dpn e 19dpn durante a lactação (Figura 2).



Figura 2 – Progênie avaliada durante o período de lactação
Fonte do autor.

2.6.5.2 Desenvolvimento geral da progênie

2.6.5.2.1 *Descolamento dos pavilhões auriculares*

Após o nascimento foi dado início a observação da progênie quanto ao descolamento bilateral completo dos pavilhões auriculares. As observações foram realizadas, diariamente, até a detecção da variável (Figura 3).



Figura 3 – Avaliação do descolamento dos pavilhões auriculares da progênie durante o período de lactação.

Fonte do autor.

2.6.5.2.2 *Aparecimento de penugem e pêlos*

A progênie foi observada quanto ao aparecimento de penugem e de pêlos. Sendo que quanto aos pêlos, as observações foram feitas, a partir do 6º dpn, diariamente, até a sua detecção na cabeça, membros e dorso dos descendentes (Figura 4).

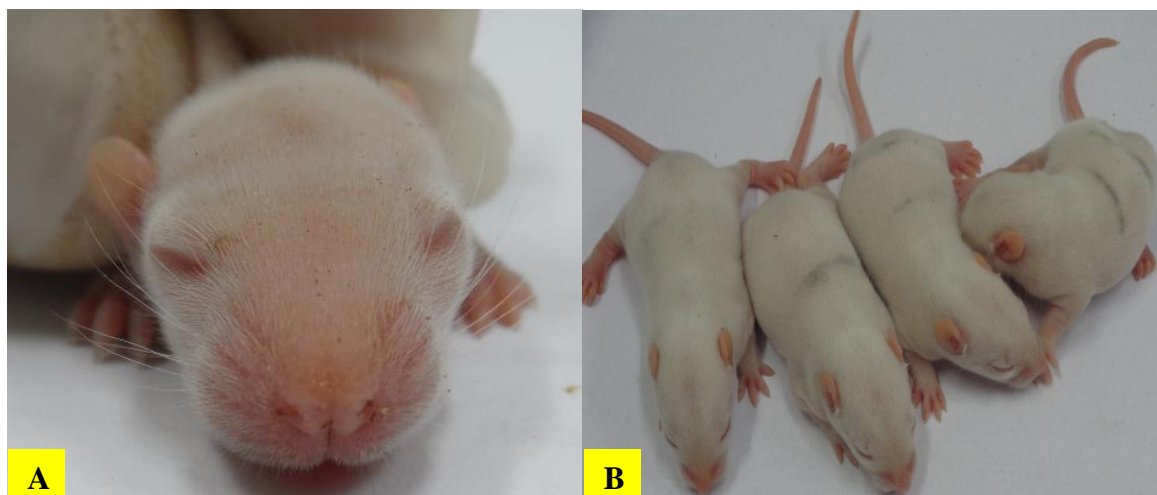


Figura 4 – Avaliação do aparecimento de penugem e pêlos da progênie durante o período de lactação. (A) Penugem. (B) Pêlos.

Fonte do autor.

2.6.5.2.3 *Abertura palpebral ocular bilateral*

A progênie foi observada a partir do 12º dia pós-natal quanto à abertura bilateral completa das pálpebras. As observações foram feitas, diariamente, até a detecção da variável (Figura 5).

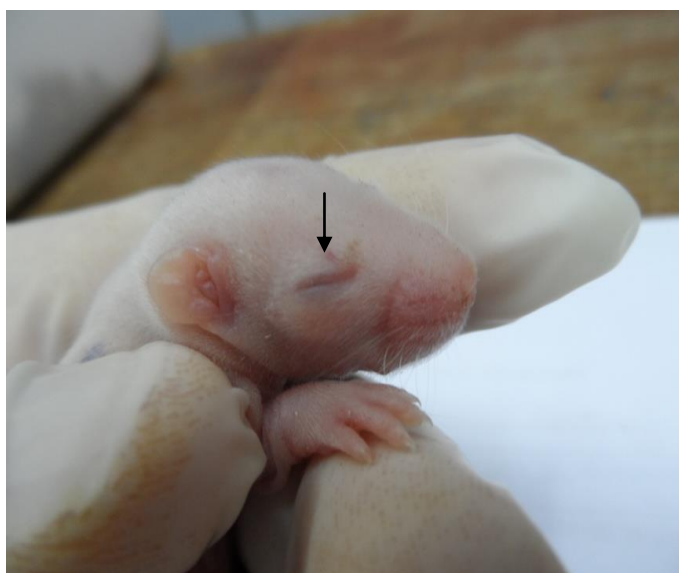


Figura 5 – Avaliação da abertura palpebral ocular bilateral da progênie durante o período de lactação. Fonte do autor.

2.6.5.2.4 *Erupção dos incisivos*

A erupção dos incisivos também foi verificada diariamente, até a detecção de tal variável (Figura 6).

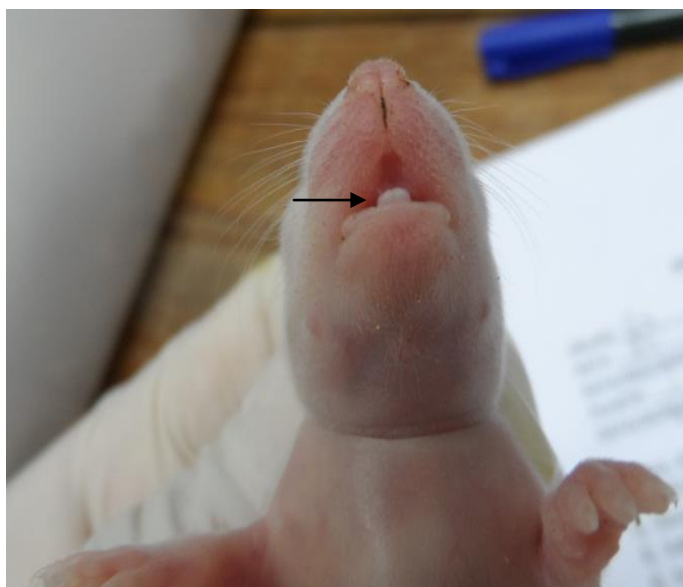


Figura 6 – Avaliação da erupção dos incisivos da progênie durante o período de lactação. Fonte do autor.

2.6.5.3 Avaliação da atividade motora

Todos os descendentes de cada grupo tiveram seu comportamento testado através do teste de campo aberto, aos 75dpm de acordo com a metodologia caracterizada por Holland e Weldon (1968). O teste consistiu na mensuração das variáveis comportamentais (número de cruzamentos pelos quadrantes (locomoção horizontal) e o número de *rearing* (locomoção vertical)), utilizando uma caixa de madeira 1m² (Figura 7) com paredes de 50 cm de altura, com sua base dividida em quadrantes de 20 cm² perfazendo um total de 25 quadrados, sendo 16 laterais (próximos às paredes) e nove centrais. Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto, registrando seu comportamento em vídeo, por cerca de 5 minutos.



Figura 7 - Caixa de madeira utilizada para a realização do teste de comportamento em campo aberto. Fonte do autor.

2.6.5.4 Avaliação sexual da progênie

Em todos os descendentes machos foram avaliados os seguintes parâmetros: descida bilateral dos testículos e separação prepucial completa. Já nos descendentes fêmeas avaliou-se a aberturado canal vaginal.

- **DESCIDA BILATERAL DOS TESTÍCULOS:** os descendentes machos foram avaliados quanto à descida bilateral dos testículos à bolsa escrotal. O momento da descida dos testículos a bolsa escrotal foi investigado através da palpação diária da bolsa escrotal a partir do 14º dia pós-natal e subsequentemente até que todos os descendentes apresentassem essa característica;
- **SEPARAÇÃO PREPUCIAL COMPLETA:** a separação prepucial foi investigada diariamente a partir do 33º dia pós-natal, através da retração manual do prepúcio, até que a separação prepucial estiver completa em todos os descendentes;
- **ABERTURA DO CANAL VAGINAL:** A partir do 30º dia pós-natal, as descendentes foram examinadas diariamente para registro do dia da completa abertura do canal vaginal.

2.6.5.5 Avaliação do ciclo estral

Após a abertura completa do canal vaginal, avaliaram-se através do exame de citologia vaginal, por um período de quinze dias consecutivos, as seguintes variáveis: primeiro estro, intervalo (dias) entre estros, regularidade do ciclo estral e duração de cada fase do ciclo estral.

- PRIMEIRO ESTRO;
- INTERVALO (DIAS) ENTRE ESTROS;
- REGULARIDADE DO CICLO ESTRAL
- DURAÇÃO DE CADA FASE DO CICLO ESTRAL

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas diversas análises foram expressos em média \pm erro padrão da média (média \pm E.P.M.) de cada grupo experimental. Para comparação dos valores médios entre os grupos de massa corporal, consumo hídrico, consumo de ração, tempo de prenhez, desenvolvimento ponderal da progênie, avaliação da atividade motora da progênie, mortalidade materna, tamanho da ninhada, intervalos entre estros, dia do 1º estro e duração de cada fase do ciclo estral foi utilizado o teste “t” de Student (não pareado). No entanto, para a avaliação dos parâmetros reprodutivos maternos, tal como índice de nascimento, índice de viabilidade, índice de desmame, desenvolvimento geral da progênie, avaliação sexual da progênie, e regularidade do ciclo estral aplicou-se o Teste Exato de Fisher. As análises estatísticas foram realizadas no software InStat GraphPad® e os gráficos foram construídos através do software GraphPad Prism® (versão 5.03). Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TOXIDADE AGUDA NAS PROGENITORAS EIII

Ao analisar as ratas expostas ao EHEEu (500 mg/kg), durante o período de desenvolvimento fetal (d16-d20), observou-se que o mesmo não foi capaz de provocar toxicidade aguda nas progenitoras, tal como: diarreia, piloereção, estresse, agitação, apatia, tremores e sangramento. Vale ressaltar, que o EHEEu também não provocou nenhum óbito.

Dessa forma, observa-se que tais resultados estão em conformidade com os dados apresentados no capítulo II deste estudo, onde as progenitoras também não apresentaram sinais clínicos de toxicidade aguda, tanto no período de pré-implantação, como no período de organogênese (pós-implantação do blastocisto).

3.2 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO PONDERAL DAS PROGENITORAS EIII

O tratamento com o EHEEu, na dose de 500 mg/kg não interferiu no ganho de massa corporal das ratas durante o período fetal. Contudo, observou-se que o grupo tratado com o EHEEu apresentou melhor desenvolvimento ponderal quando comparado ao grupo controle, sem diferença estatística significativa (Figura 8).

Devido um agente químico ter a capacidade de interferir no desenvolvimento dos descendentes por afetar de forma direta os filhotes, ou indireta, ao comprometer a capacidade da mãe em sustentar a prole, tais informações são importantes e devem ser levadas em consideração na interpretação dos efeitos tóxicos de uma substância (MELLO, 2007).

A toxicidade das progenitoras inclui sinais clínicos, alteração no comportamento e ganho reduzido de massa corporal durante o período de gestação (CHERNOFF et al., 2008). Neste estudo, esses parâmetros não foram afetados com a administração do EHEEu.

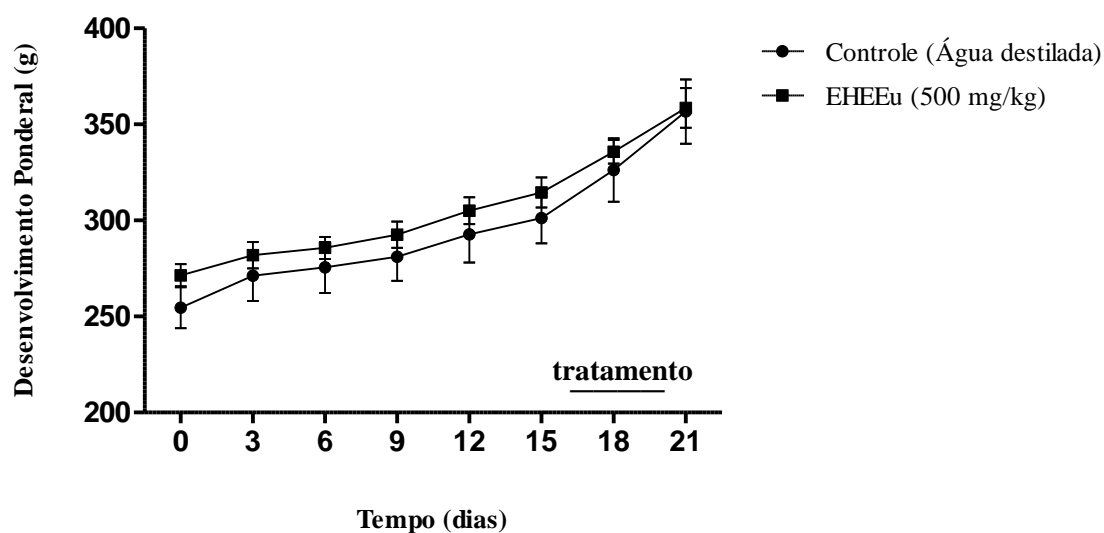


Figura 8 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 5/grupo). * p <0.05 comparado ao grupo controle.

3.3 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO DAS PROGENITORAS EIII

Ao analisar a ingestão de água durante o período de tratamento (d16-20) observou-se que o grupo tratado com o EHEEu (500 mg/kg) teve um comportamento semelhante ao grupo controle, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos, exceto no vigésimo primeiro dia (d21) de prenhez, onde as ratas do grupo controle apresentaram uma diminuição no consumo hídrico. Dessa forma, o EHEEu não interferiu na ingestão de água durante o período de desenvolvimento fetal (Figura 9).

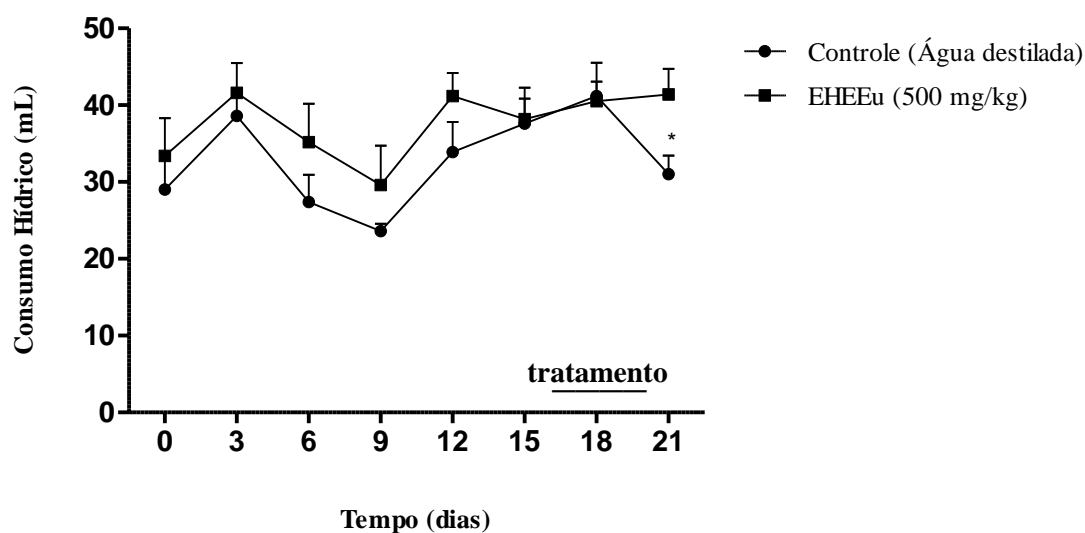


Figura 9 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre a ingestão de água (mL) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 5/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

O consumo de ração das ratas tratadas com o EHEEu, no período fetal não foi alterado. Contudo, no vigésimo primeiro (d21) dia de prenhez tanto as ratas do grupo controle quanto as do grupo tratado apresentaram uma diminuição em seu consumo, com diferença estatística significativa (Figura 10). No entanto, vale ressaltar que essas alterações no consumo de ração em ambos os grupos e no consumo hídrico no grupo controle (d21) não influenciou no desenvolvimento ponderal desses animais (Figura 8). Essa diminuição do consumo de água e ração, no final do período gestacional está possivelmente relacionada com a aproximação da hora do parto, onde nesse experimento ocorreu por volta do 22º dia de prenhez, tanto das ratas do grupo controle quanto das tratadas com o EHEEu.

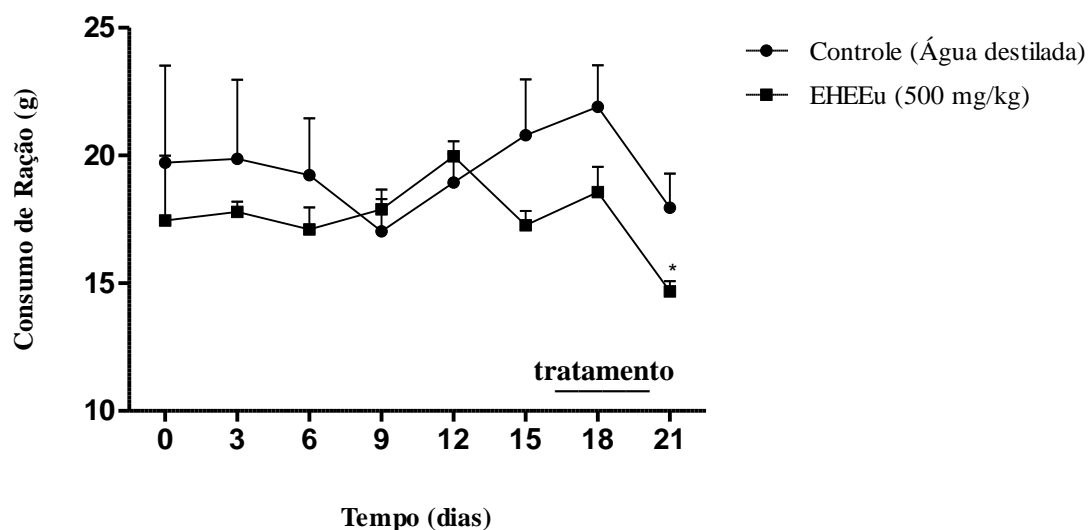


Figura 10 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o consumo de ração (g) de ratas prenhas, linhagem Wistar, tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 5/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

3.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DAS PROGENITORAS EIII

Os parâmetros reprodutivos das progenitoras, tal como tempo de prenhez, índice de nascimento, índice de viabilidade, índice de desmame e tamanho da ninhada não foram alterados após tratamento com o EHEEu (500 mg/kg) no período de desenvolvimento fetal, pois não houve diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (Tabela 1).

Segundo Osweiller (1998), as análises das diversas taxas reprodutivas proporcionam em conjunto um excelente indicador da interferência de diferentes substâncias químicas sobre a reprodução, podendo indicar o período no qual os efeitos tóxicos reprodutivos ocorreram (LEMONICA; DAMASCENO; DI-STASI, 1996).

Valores referentes à duração da gestação (d), ao número de filhotes ao nascimento (%), tamanho da ninhada (n), a viabilidade dos filhotes (%), entre outros parâmetros, são dados analisados que indicam a presença ou ausência de toxicidade materna e embriofetal. Quanto a tais parâmetros avaliados, os resultados do presente estudo infere que a administração do EHEEu não afetou as taxas reprodutivas observadas, indicando a ausência de toxicidade materna e embriofetal.

Tabela 1 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre a performance reprodutiva materna de ratas prenhas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20).

	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Mortalidade Materna (n)	0	0
Tempo de Prenhez (dias)	22.2 ± 0.20	22.2 ± 0.20
Índice de Nascimento (%)	100 ± 0.00	100 ± 0.00
Índice de Viabilidade (%)	100 ± 0.00	100 ± 0.00
Índice de Desmame (%)	90.00 ± 10.00	97.77 ± 2.22
Tamanho da Ninhada (n)	9.40 ± 1.16	9.40 ± 0.24

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média ± E.P.M. Nas variáveis indicadas como índices ou percentuais foi aplicado o Teste Exato de Fisher e nas variáveis com medidas ordinais foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 5/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

3.5 AVALIAÇÃO DA PROGÊNIE EIII

3.5.1 Desenvolvimento ponderal da progênie

A massa corporal (g) ao nascer, e ao desmame não diferiu ($p < 0.05$) entre os descendentes de ratas expostas ao controle e ao EHEEu, na dose de 500 mg/kg, no período de desenvolvimento fetal. O desenvolvimento ponderal (g) dos filhotes durante a lactação também não foi alterado (Figura 11).

Moore e Persaud (2004), afirmam que o período fetal é caracterizado pelo acelerado ganho de peso corpóreo, devido ao grande acúmulo de tecido adiposo subcutâneo. Nos ensaios biológicos *in vivo* relacionados com a avaliação de toxicidade fetal, diversos fatores são considerados, tais como mortalidade, presença de anomalias e redução no peso corpóreo. (CHERNOFF et al., 2008).

Cantarutti (2005), afirma que variações no desenvolvimento ponderal podem indicar efeitos negativos no desenvolvimento dos filhotes. Assim como a diminuição ou o aumento no tempo de prenhez pode influenciar na sobrevivência dos mesmos. A taxa de sobrevivência e o ganho de massa dos filhotes na lactação são dependentes de sua massa ao nascer, do estado de saúde de cada indivíduo, além do tamanho da ninhada. Neste estudo é importante destacar que o peso dos filhotes não foi alterado, assim como o tempo de prenhez e tamanho das ninhadas não influenciaram negativamente na viabilidade da progênie, pois ambos os parâmetros não diferiram significativamente nas ratas expostas ao EHEEu (500 mg/kg).

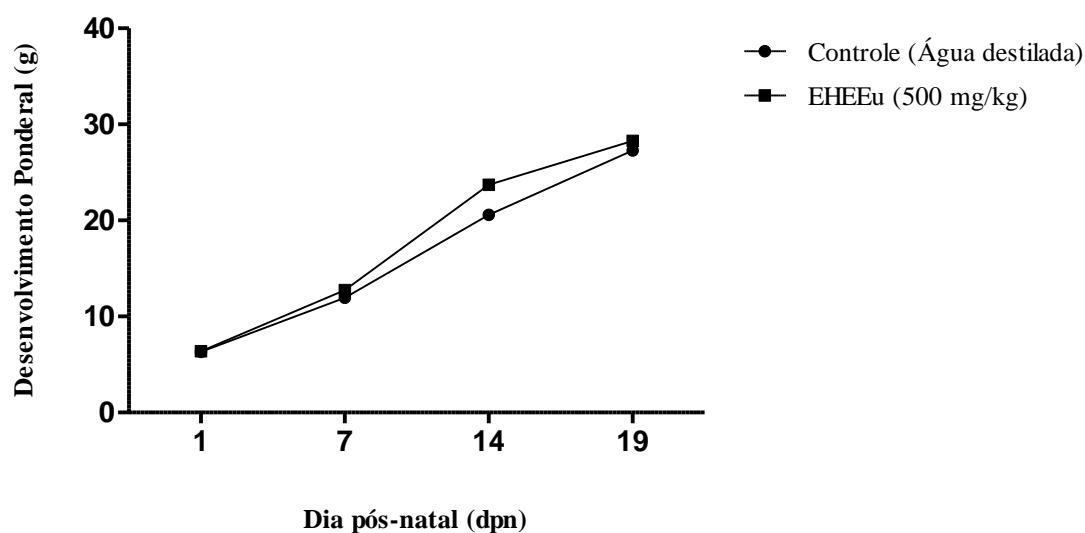


Figura 11 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento ponderal (lactação) da progênie de ratas tratadas no período de desenvolvimento fetal (d16-d20). No grupo controle foi administrada água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média \pm E. P. M. Foi aplicado o Teste “t” de Student (não pareado), sendo (n= 5/grupo). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

3.5.2 Desenvolvimento geral da progênie

Os parâmetros utilizados para a avaliação de desenvolvimento geral da prole como período (dias) para o descolamento dos pavilhões auriculares, aparecimento da penugem, erupção dos incisivos, aparecimento de pêlos, abertura dos olhos e razão sexual não foram alterados, pois não se observou diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 2).

Nota-se que após a exposição a tóxicos, tanto no período pré-natal como no pós-natal podem produzir mudanças que não podem ser observadas, além de que esses tais efeitos podem ser irreversíveis. Os resultados adversos no desenvolvimento, em ambos os sexos podem resultar através da exposição a agentes tóxicos no útero e no leite das progenitoras (EPA, 1996).

No presente estudo, a progênie de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal não apresentaram alterações no seu desenvolvimento geral e ponderal. Assim, sugere-se que o EHEEu (500 mg/kg) não interferiu sobre o desenvolvimento geral da prole.

Tabela 2 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre o desenvolvimento geral da progênie de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20).

	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Descolamentos dos pavilhões auriculares (até o 3 dpn)	100 %	100 %
Aparecimento de Penugem (até o 5 dpn)	100 %	100 %
Aparecimento de pêlos (cabeça, membros e dorso) (até o 8 dpn)	100 %	100 %
Erupção dos Incisivos (até o 9 dpn)	93.61 %	78.72 %
Abertura dos olhos (até o 14 dpn)	100 %	100 %
Razão sexual (M/F)	88%	147.3%

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média \pm E.P.M. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

A literatura faz relatos de estudos avaliando o desenvolvimento pós-natal de diferentes extratos extraídos de plantas medicinais. Castro, Mello e Mello (2005), fizeram a avaliação toxicológica do *Ginkgo biloba* sobre a reprodução de ratos Wistar. Não houve interferência sobre a gestação, índices reprodutivos e de desenvolvimento pós-natal em relação ao grupo controle. Em relação aos filhotes, os mesmo apresentaram desenvolvimento pós-natal com aparecimento das características de desenvolvimento sexual dentro do período previsto para a espécie.

Na mesma linha, Mello (2007) avaliou a toxicidade pré-clínica de fitoterápicos contendo *Erythrina mulungu*, *Leptolobium elegans* e *Adonis vernalis*. O acompanhamento do desenvolvimento pós-natal da progênie nascida das ratas tratadas durante a gestação e amamentação com Ritmoneuran Solução®, Ritmoneuran Cápsulas® não mostrou diferença estatística em relação a progênie nascida das ratas controle.

Hollenbach et al. (2010) avaliaram o desenvolvimento pós-natal e potencial teratogênico da prole de ratos Wistar (toxicidade reprodutiva) de duas preparações fitoterápicas contendo extrato de soja *Glycine max* (L.) Merr. Os autores relataram em seus resultados que ratos Wistar não comprometeram o desenvolvimento geral de sua progênie, assim como não determinaram efeitos embriotóxicos aos fetos.

3.5.3 Avaliação da atividade motora da progênie

Avaliou-se o teste de comportamento em campo aberto, que ocorreu no 75 dpn, sendo que todos os filhotes (machos e fêmeas), tanto do grupo controle quanto do grupo tratado com o EHEEu (500 mg/kg) foram submetidos ao teste. Tais animais de ambos os grupos foram avaliados em duas categorias comportamentais (quadrante e rearing), onde nenhuma dessas foi alterada. Assim, pode-se inferir que o EHEEu não interferiu na atividade locomotora da progênie de ratas exposta durante o período de desenvolvimento fetal (Tabela 3).

Segundo Sachetti (2009), o teste de campo aberto é um das ferramentas mais utilizadas na avaliação comportamental e da função motora de animais. Neste estudo, o EHEEu (500 mg/kg) não interferiu na atividade locomotora e exploratória da progênie.

Tabela 3 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre a atividade motora da progênie de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20).

	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Quadrantes	96,93 ± 6,47	107,42 ± 6,22
Rearings	32,41 ± 2,84	38,47 ± 2,09

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média ± E.P.M. Foi aplicado o Teste “t” de Student (não pareado). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

3.5.4 Avaliação sexual da progênie

A exposição de ratas ao EHEEu no período de desenvolvimento fetal com 500 mg/kg não afetou a descida bilateral dos testículos e separação prepucial completa. Contudo, alterou o tempo de abertura do canal vaginal das ratas quando comparado ao grupo controle ($p < 0.05$) (Tabela 4).

Para Mably et al. (1992) as características sexuais (abertura do canal vaginal, separação prepucial completa, descida bilateral dos testículos) são considerados eventos hormônio-dependente, sendo que qualquer alteração responsável por alguma interferência na produção hormonal pode influenciar nas manifestações de tais características. Neste estudo, foi verificada a alteração no parâmetro abertura do canal vaginal (dias) do grupo tratado com o EHEEu (500 mg/kg).

Tabela 4 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre a avaliação sexual dos descendentes (machos e fêmeas) de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20).

Variáveis/Grupos	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Descida bilateral dos testículos (até 17 dpn)	100 %	100 %
Separação prepucial completa (a partir do 33 dpn)	100 %	100 %
Abertura do canal vaginal (30 dpn ao 38 dpn)	90.90 %	64,28 %*

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média \pm E.P.M. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

3.5.5 Avaliação do ciclo estral

Apesar de o EHEEu 500 mg/kg ter adiado o tempo de abertura do canal vaginal das ratas e conseqüentemente adiado também o aparecimento do 1º estro ($p < 0.05$), esses fatores não afetaram o intervalo de dias entre os estros desses animais, assim como, a regularidade do ciclo estral quando comparado ao grupo controle (Tabela 5).

Para EPA (1996) agentes químicos e físicos podem afetar o sistema reprodutivo feminino em qualquer período do ciclo de vida, incluindo os períodos suscetíveis do desenvolvimento. Vale resaltar que o sistema reprodutor começa a ser formado no início da gestação, contudo, a maturação estrutural e funcional só se completa na puberdade. Para que tanto o sistema neuroendócrino reprodutivo quanto os ovários estejam funcionando normalmente, o ciclo estral precisa apresenta-se de forma regular, ou seja, normal. Contudo, diversos compostos podem induzir alterações no ciclo estral sem comprometer a fertilidade (PRESIBELLA, 2004; EPA, 1996).

O ciclo estral de ratas tem duração média de quatro ou cinco dias, sendo caracterizado por quatro fases, tal como proestro, estro, metaestro (diestro I) e diestro (diestro II). Em virtude da curta duração de seu ciclo estral, os referidos animais constituem bom modelo para o estudo das alterações que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Paccola et al. (2013) ao fazerem em seu estudo a revisão do ciclo estral de rata (análise quantitativa e qualitativa) chegaram a conclusão de que tal estudo demonstrou que a análise quantitativa das populações de células em esfregaços vaginais melhora a identificação das fases do ciclo estral e pode contribuir para uma detecção mais precisa das alterações cíclicas. Neste estudo, a administração do EHEEu (500 mg/kg) não foi capaz de alterar a regularidade do ciclo estral da progênie feminina de ratas expostas no período de desenvolvimento fetal.

Tabela 5 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre a regulação do ciclo estral por um período de 15 dias, das descendentes fêmeas de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20).

Descendentes Fêmeas	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
Dia do 1º estro (dpn)	35.50 ± 1.43	50.28 ± 1.47*
Intervalo (dias) entre estros (dias)	5.16 ± 0.65	5.11 ± 0.65
Ciclo regular (%)	8 %	15.70 %

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média ± E.P.M. Nas variáveis indicadas como índices ou percentuais foi aplicado o Teste Exato de Fisher e nas variáveis com medidas ordinais foi aplicado o teste “t” de Student (não pareado). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

No presente estudo, a duração de cada fase do ciclo não foi diferente ($p < 0.05$) ao comparar os grupos controle e tratado com o EHEEu (500 mg/kg) (Tabela 6). Contudo, a duração de cada fase referente a ambos os grupos (controle e tratado) não se apresentou dentro dos valores de referência indicado para a espécie, onde a normalidade de duração (h) de cada fase do ciclo estral de ratas corresponde a proestro (12 h), estro (14 h), metaestro (21h) e diestro (57 h). Dessa forma, estudos adicionais são necessários para maior interpretação desses resultados.

Tabela 6 - Efeito do tratamento por via oral com EHEEu, preparado das cascas de *Endopleura uchi* (500 mg/kg), sobre a duração de cada fase do ciclo estral por um período de 15 dias, das descendentes fêmeas de ratas tratadas durante o período de desenvolvimento fetal (d16 – d20).

	CONTROLE	EHEEu 500 mg/kg
PROESTRO	0.83 ± 0.30	1.11 ± 0.20
ESTRO	1.33 ± 0.21	1.11 ± 0.11
METAESTRO	2.33 ± 0.42	2.11 ± 0.35
DIESTRO	1.33 ± 0.42	1.77 ± 0.40

O grupo controle recebeu água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a média ± E.P.M. Foi aplicado o Teste “t” de Student (não pareado). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo nos permite inferir que a administração oral do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. uchi*, na dose de 500 mg/kg, no período de desenvolvimento fetal de ratas Wistar não provocou toxicidade materna e não alterou os parâmetros reprodutivos maternos, assim como, não alterou a atividade motora, o desenvolvimento ponderal e geral progênie (descolamento dos pavilhões auriculares, aparecimento de penugem e pêlos, erupção dos incisivos, abertura dos olhos e razão sexual). Quanto ao desenvolvimento sexual, os descendentes machos não foram afetados, contudo, as descendentes fêmeas tiveram tal parâmetro alterado.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, W. L. R.; TAVARES, I. C. C. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. 1 ed. Belém: UFPA, 2001. v. 01. 20 p.

BORTOLINI, C. E. Efeito da administração de fitoterápico contendo *Glycine Max (L) Merr* durante o período de organogênese em ratos Wistar. 2009. 78 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CANTARUTTI, T. F. P. **Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos wistar**. 2005. 73 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CASTRO, A.P.; MELLO, F.B.; MELLO, J.R.B. Avaliação toxicológica do Ginkgo bilobasobre a fertilidade e reprodução de ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.265-9, 2005.

CHERNOFF, N. et al. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the "no observed adverse effect level". **Reproductive Toxicology**, v.25, p.192-202, 2008.

FRITZ, H.; GIESE, K. Evaluation of the Teratogenic Potential of Chemicals in the Rat. **Pharmacol**, v. 40, p. 1-28, 1990.

HOLLAND, H. C.; WELDON, E. A note on a new technique of recording ambulation in the open field test and its validation. **Acta Psychol (Amst)** v. 28. p. 293-300, 1968.

HOLLENBACH, C. B.; BORTOLINI, C. E.; BATISTA, J. M.; HOLLENBACH, E. B.; SCHUCH, T. L.; PACHECO, M. G.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. Desenvolvimento pós natal e potencial teratogênico da prole de ratos Wistar no estudo da toxicidade reprodutiva de duas preparações fitoterápicas contendo soja *Glycine max (L.) Merr*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 845-852, 2010.

HOLLENBACH, C. B. **Estudo da Toxicidade reprodutiva de duas formulações fitoterápicas comerciais contendo soja [*Glycine max (L.) Merr*] em ratos Wistar**. 2008. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

LEMONICA, L. P; DAMASCENO, D. C; DI-STASI, I. C. Study the embryotoxic effects of extract of Rosemary (*Roramarinus officinalis L.*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 223-227, 1996.

MABLY, T. A., MOORE, R. W. and PETERSON, R. E., 1992. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 114, p. 97-107.

MARCONDES, F. K; BIANCHI, F. J; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.

MELLO, M. S. C.; **Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifetil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos.** 2007. 154 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

MELLO, F. B.; LANGELOH, A. L.; MELLO, R. B. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Passiflora alata*, *Erythrina mulungu*, *Leptolobium elegans* e *Adonis vernalis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, p. 191-200, 2007.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica.** Elsevier, Rio de Janeiro, 2004. 609 p.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica.** 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 536 p.

NAROTSKY, M. G.; KAVLOCK, R. J. A multidisciplinary approach to toxicological screening: II developmental toxicity. **Journal of Toxicology Environmental Health**, v. 45, p. 145-171, 1995.

OSWEILER G. D. 1998. **Toxicologia Veterinária.** Porto Alegre: Artes Médicas, 526 p.

PACCOLA, C.C.; RESENDE, C.G.; STUMPP, T.; MIRAGLIA, S.M.; CIPRIANO, I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Animal Reproduction**, v.10, p.677-683, 2013.

ROGERS, J. M.; KALVLOCK, R. J. Developmental toxicology. *In:* KLAASEN, C. D. (Ed.) **Cassarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons.** 6th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 107-132.

PRESIBELLA, K. M. **Efeitos da associação dos pesticidas deltametrina e endossulfano sobre o sistema reprodutivo de ratos wistar.** 2004. 125 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em farmacologia) - Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

SACHETTI, C. G. Fascineli, M. L.; Sampaio, J. A.; Lameira, O. A.; Caldas, E. D. Avaliação da Toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, p. 937-941, 2009.

TABASSUM, N.; AHMAD, F. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. **Pharmacognosy Reviews**, v.5, p. 30-40, 2011.

US EPA- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA/630/R 96/009:** Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment Washington, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. WHO/PCS/EDC/02.2 180 p. **WHO.**, Geneve, 2002.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A administração oral do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *E. uchi*, na dose de 500 mg/kg, durante o teste de toxicidade subcrônica e durante os períodos de pré-implantação, organogênese e fetal de ratos Wistar nos permite concluir que:

- **Toxicidade subcrônica:** não causou toxicidade sistêmica após 22 dias consecutivos de exposição, pois não alterou os parâmetros bioquímicos e hematológicos, desenvolvimento ponderal e ingestão de água e ração.
- **No período de pré-implantação:** como não alterou nenhum dos parâmetros avaliados no desenvolvimento reprodutivo, sugere-se que nem o processo do transporte do embrião, nem o de implantação foi afetado pelo extrato da planta.
- **No período de organogênese:** provocou perdas pós-implantes;
- **Nos períodos de pré-implantação e organogênese:** não causou embriofetotoxicidade, pois não interferiu no tamanho dos RNs avaliados (PIP, AIG e GIP), assim como não casou teratogenicidade em ratos, uma vez que não houve aumento na frequência de alterações e/ou malformações externas e internas (esqueléticas e viscerais), nem alterou os pontos de ossificação, não provocou efeitos adversos para as progenitoras, por não ter ocasionado morte e toxicidade materna nos diversos parâmetros analisados;
- **No período de desenvolvimento fetal:** não provocou efeitos nocivos para as progenitoras, por não ter sido evidenciada morte e toxicidade materna. Não interferiu no desenvolvimento pós-natal dos descendentes quanto aos parâmetros de desenvolvimento ponderal e geral, assim como não alterou a atividade motora, no teste de campo aberto. Por fim, interferiu somente no desenvolvimento sexual dos descendentes fêmeas.

Vale ressaltar que até o presente momento não existiam dados na literatura avaliando a toxicidade subcrônica e reprodutiva de *E. uchi*, informações importantes devido a sua grande utilização de forma tradicional, principalmente pela população da região amazônica. Assim, este trabalho torna-se pioneiro, servindo como referência para as demais pesquisas. Contudo, sua continuação com novos estudos relacionados à segurança se faz necessária para melhor elucidar esses achados e determinar novas dosagens e testes em outras espécies.