



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MOEMA SOUSA DE OLIVEIRA

Toxicidade reprodutiva do óleo essencial de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth) no macho adulto e no desenvolvimento da prole em ratos

**Teresina (PI)
2018**

MOEMA SOUSA DE OLIVEIRA

Toxicidade reprodutiva do óleo essencial de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth) no macho adulto e no desenvolvimento da prole em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para a obtenção do título Doutor em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

TERESINA/PI
2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

O48t Oliveira, Moema Sousa de
Toxicidade reprodutiva do óleo essencial de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth) no macho adulto e no desenvolvimento da prole em ratos / Moema Sousa de Oliveira - 2018.
58 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

1.*Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi) 2 .Espermatozoides 3. Fertilidade 4. Progênie I.Título.

CDD 615.7

**TOXICIDADE REPRODUTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE JABORANDI
(*PILOCARPUS MICROPHYLLUS* STAPF EX WARDLEWORTH) NO MACHO
ADULTO E NO DESENVOLVIMENTO DA PROLE EM RATOS**

MOEMA SOUSA DE OLIVEIRA

Tese aprovada em: 31/08/2018

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



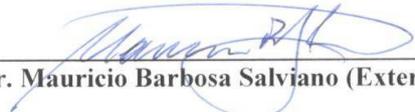
Profa. Dra. Maria Zenaide de Lima C. Moreno Fernandes (Interna) /
DBF/CCS/UFPI



Dra. Adeline de Andrade Carvalho (Interna) CCA/UFPI



Profa. Dra. Alessandra Camillo da Silveira Castello Branco (Externa) / FSA



Prof. Dr. Mauricio Barbosa Salviano (Externo) / FACID

Dedico,

*Á Deus, meu Pai, Mestre dos mestres, Ajudador e Consolador até aqui e para sempre,
A minha mãe, Maria dos Anjos, que sonhou com um nível superior para mim e graças a ela me
tornei o que eu sou hoje.*

*Ao meu pai João Benício, que me acolheu em toda formação, símbolo de força e coragem.
Ao meu Marido, Rafael Viana, sempre foi meu alicerce, minha força, meu maior apoiador e
incentivador.*

*A minha filha, Luísa Araújo, símbolo de inocência e pureza e que tenho um amor
incondicional.*

*A Teresinha Viana e José Luís, que me deram as mãos nos momentos de dificuldade, gratidão
eterna.*

*Aos meus amigos, e em especial a Dayseanne Bezerra, que sempre quando precisei me estendeu
a mão e me orientou em tudo o que precisei.*

*Ao meu orientador e amigo, Prof. Amilton Raposo, sempre foi muito paciente, dedicado e que
me acolheu como um pai e amigo, meu muito obrigada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a meus pais, Maria dos Anjos e João Benício pela minha vida.

Agradeço à Universidade Federal do Piauí e a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes).

A empresa Phytobios Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, pela pronta colaboração e fornecimento do óleo essencial de Jaborandi que faz parte dessa tese.

Ao meu marido, Rafael Viana, pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos.

Aos meus Sogros, Teresinha Viana e José Luís, pelo acolhimento e carinho de todos os momentos.

A meu orientador Dr. Amilton Paulo Raposo Costa, pela experiência, sabedoria e firmeza em conduzir nossos trabalhos e por acreditar sempre.

A minha amiga, Dayseanne Bezerra, que foi meu apoio em todos os momentos da tese, amiga e conselheira, gratidão!

A Indianna Lua Mendes Araújo, pelas ajudas na parte laboratorial e com o manejo dos ratos, bem como a compreensão que fez esse trabalho se tornar um degrau a mais.

Ao amigo Raphael Briseno Frota, pela paciência, colaboração e conhecimento transmitido na execução dos trabalhos.

A minha amiga Terysdalva Pereira da Costa, gratidão pela ajuda e conhecimento e por sempre acreditar no trabalho.

A todos os docentes que ministraram aulas e compartilharam seus conhecimentos e experiências durante o curso de Doutorado.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1 <i>Pilocarpus microphyllus</i>	4
2.2 Toxicidade reprodutiva e teratogenicidade	6
2.3 Anatomia do aparelho reprodutor de machos.....	9
3. CAPÍTULO I: Avaliação Toxicológica do Óleo Essencial de jaborandi (<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth) em progênes de Ratos.....	11
Resumo	12
Introdução	12
Material e Método	13
Resultados	14
Discussão	18
Conclusões.....	20
Referências	20
4. CAPÍTULO II: Avaliação da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de Jaborandi (<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth) em ratos machos Wistar.....	23
Resumo	24
Introdução	25
Materiais e métodos	26
Resultados	28
Discussão	31
Considerações Finais.....	39
Referências	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância Anova
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EPI	Epiisopiloturina
OECD	Organização para Cooperação Econômica e desenvolvimento
OE-Pm	Óleo essencial de <i>Pilocarpus microphyllus</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PIL	Pilocarpina
RENISUS	Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SCN	Sistema Nervoso Central
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SUS	Sistema Única de Saúde
UFPI	Universidade Federal do Piauí

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição das espécies do gênero *Pilocarpus* nos diferentes estados Brasileiros.....

Figura 2- Folhas e frutos de Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)..... 3

Capítulo I

Figura 1 –tempo decorrido para descida testículos de progênie tratadas com tween 80 e óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus*20

Figura 2 – tempo decorrido para separação prepucial de progênie tratadas com tween 80 e óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus*.....21

Figura 3 –tempo decorrido para abertura do canal vaginal em ratas tratadas com tween 80 e óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus*.....22

Capítulo II

Figura 1. Efeito do tratamento de ratos com óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* na concentração espermática..... 34

Figura 2. Fotomicrografia: túbulo seminífero.....

LISTA DE TABELA

Capítulo I

Tabela 1 Tempo médio (dias) para o aparecimento das características de desenvolvimento geral da progênie.....	19
--	----

Capítulo II

Tabela 1. Peso dos órgãos de ratos tratados com óleo essencial de <i>Piloricarpus microphyllus</i> comparado com o controle	33
--	----

Tabela 2- - Avaliação da Motilidade e vigor de espermatozoides de ratos tratados com EE-Pm	33
---	----

RESUMO

Pilocarpus microphyllus Stapf ex Wardleworth (jaborandi, Rutaceae) é uma das mais importantes espécies de plantas medicinais brasileiras devido ao seu conteúdo de pilocarpina (PIL), um alcalóide usado no tratamento de glaucoma e xerostomia. Apesar de muito utilizada na medicina popular para diversos tratamentos, no entanto não há relatos na literatura sobre seus efeitos no sistema reprodutor. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar os possíveis efeitos do OE-Pm sobre o sistema reprodutor de ratos machos e no desenvolvimento de sua progênie. Para a avaliação de toxicidade nas progênes, as fêmeas prenhes (n=28) foram divididas em quatro grupos, sendo um grupo controle com Tween-80 a 1% e três grupos tratados com OE-Pm nas doses de 25, 50 e 100mg/kg por via oral, do oitavo dia de prenhez até o desmame. As progênes foram avaliadas diariamente quanto a quantidade de filhotes, peso ao nascer(g), deslocamento dos pavilhões auriculares, surgimento de pelos, abertura palpebral bilateral, abertura do canal vaginal, descida dos testículos e separação prepucial. A avaliação com os machos foram utilizados 28 ratos Wistar divididos em 4 grupos: grupo controle (Tween 80 a 1%) e três grupos de tratamento com OE-Pm nas doses de 25, 50 e 100mg/kg, por via oral por 60 dias. Foram realizados os seguintes testes: coleta dos órgãos e pesagem, análise de motilidade, vigor e concentração espermática. Os dados paramétricos foram avaliados por análise de variância seguida pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) e os não paramétricos pelo teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparações múltiplas. Os resultados do protocolo das progênes indicam que os parâmetros quantidade de filhotes, peso ao nascer (g), deslocamento dos pavilhões auriculares e surgimento de pelos não foram alterados de forma significativa ($p < 0,05$). Contudo, as análises de abertura palpebral, abertura do canal vaginal, descida dos testículos e separação prepucial, analisados em dias, indicaram um retardo significativo nas progênes de ratas tratadas com o óleo. Os resultados para a avaliação nos machos demonstraram que o peso da próstata de ratos tratados com óleo na dose de 100mg/kg diminuiu significativamente ($p < 0,05$) com relação ao controle, assim como a concentração espermática nas doses de 50 e 100mg/kg com relação ao controle e a dose de 25mg/kg de OE-Pm. O vigor e a motilidade espermática não foram alteradas de forma significativa. Os animais não apresentaram sinais comportamentais de toxicidade. Assim, conclui-se que o óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* apresenta efeitos tóxicos no desenvolvimento inicial da prole assim como no sistema reprodutor do macho adulto.

Palavras- chave: *Pilocarpus microphyllus* (jaborandi); espermatozoides; fertilidade; progênie

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the possible effects of oral administration of the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* (OE-Pm) on the progeny development and on the reproductive system of male rats. For the experimental protocol of progeny toxicity, females pregnant, total of 28, were divided into four groups, being a control group with 1% Tween-80 and three groups treated with OE-Pm at doses of 25, 50 and 100mg / kg orally, from the eighth day of pregnancy until weaning, and progenies were evaluated in relation to the number of pups, birth weight (g), opening of the auricles, appearance of hair, bilateral opening of the eyelid, opening of the vaginal canal, descent of the testicles and preputial separation. For protocol in rats were used 28 Wistar rats were divided into 4 groups according to dosage: control group (Tween 80, 1%) and three treatment groups with EO, pm at doses of 25, 50 and 100mg / kg , orally for 60 days. . The following tests were performed: organ collection and weighing, analysis of motility, vigor and sperm concentration. The parametric data were evaluated by analysis of variance followed by the Bonferroni test ($p < 0.05$) and the nonparametric ones by the Kruskal Wallis test followed by the Tukey test ($p < 0.05$) for multiple comparisons. The results of the progeny protocol indicate that the parameters number of pups, birth weight (g), displacement of the atrial pavilions and appearance of hairs were not significantly altered, but the analyzes: palpebral opening, vaginal opening, testis descent and preputial separation, analyzed in days, indicated a significant delay in the progenies of rats treated with the oil. The results for the protocol in males showed that the prostate weight of rats treated with oil at the dose of 100mg / kg decreased significantly with respect to the control. as well as the sperm concentration at doses of 50 and 100mg / kg in relation to the 25mg / kg dose control. The analyzes of vigor and motility were not significantly altered. In the histopathological analysis of the testicles, no changes were observed in relation to the control group. The animals showed no behavioral signs of toxicity. It is concluded that the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* presents toxic effects on the early development of the offspring as well as on the adult male reproductive system.

Keywords: fertility, spermatozoon, progeny

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre o poder curativo das plantas é tão antigo quanto o aparecimento da espécie humana na terra. Desde cedo as primeiras civilizações perceberam, empiricamente, que algumas plantas continham poder curativo ao serem experimentadas no combate às doenças (BADKE et al, 2011). Neste sentido, as feiras e mercados tradicionais são o centro de compra e venda que comercializam produtos vegetais e animais, concentrando-se em manter e difundir o conhecimento empírico sobre estes recursos (ALBUQUERQUE et al, 2014). Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida, na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utiliza práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas em diferentes preparações (SILVA, 2002).

No entanto, com o avanço científico, essa prática ficou menos frequente devido à utilização de medicamentos sintéticos. Mas, devido ao alto custo desses medicamentos e efeitos indesejáveis tanto ao homem quanto ao meio ambiente, a utilização de produtos naturais como alternativa terapêutica voltou a ter destaque (ROCHA, 2006; MACHADO, 2011).

Dentro desta perspectiva, a biodiversidade brasileira tem sido estudada extensivamente e um número crescente de estudos relacionados a espécies de plantas e recursos naturais tem contribuído para novas alternativas terapêuticas. Um exemplo dessa flora diz respeito à espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth, popularmente conhecida como jaborandi, originárias do Norte e Nordeste do Brasil (ROCHA et al, 2017).

Diversos estudos revelam que folhas de jaborandi, como outras espécies de plantas, contêm vários metabólitos bioativos cujas propriedades farmacológicas e fisiológicas ainda não foram completamente elucidadas ou ainda estão sendo estudadas. Dentre os princípios ativos encontrados nas folhas a epiisopiloturina (EPI), um alcalóide com atividade anti-esquistossômica (BENTO et al, 2010; VERAS et al, 2012; GUIMARÃES et al, 2014; GUIMARÃES et al, 2015).

No Brasil suas folhas são utilizadas como diurético, sudorífico, digestivo, sialogogo, tônico capilar e para inflamação ocular (TAVEIRA et al., 2003). De acordo com a medicina popular, esta espécie é utilizada para dor de ouvido, cólicas em

crianças, sinusite e até mesmo "mau olhado" e "amuleto". As folhas são usadas na forma de chá, infundido e macerado.

Porém, o surgimento do conceito de “natural”, em muito contribuiu para o aumento no uso das plantas medicinais nas últimas décadas. Para muitas pessoas esse conceito significa “ausência de efeito maléfico”, que são aqueles que podem causar algum dano, ou de outra forma, representa perigo. Assim, produtos naturais passaram a ser sinônimo de produtos saudáveis, seguros e benéficos (MENGUE et al, 2001).

Contudo, as plantas possuem substâncias ativas e, muitas vezes, o efeito tóxico sobre o organismo é desconhecido ou ignorado pelos usuários. Daí a importância do conhecimento sobre o consumo de plantas para fins terapêuticos para uso seguro, eficaz e consciente (ARRUDA, 2013).

Os estudos de toxicidade pré-clínica necessitam indicar o grau de confiança a se depositar em determinado medicamento com vistas à administração em seres humanos (MELLO; LANGELOH; MELLO, 2007) e animais. Tais estudos devem ser realizados com base em protocolos aceitos internacionalmente. No Brasil a legislação que regulamenta a realização de testes pré-clínicos de toxicidade para medicamentos fitoterápicos é a Resolução N° 90 de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil (ANVISA, 2004). É estipulado que testes de avaliação de risco sejam realizados em duas espécies de mamíferos, uma roedora e uma não roedora, machos e fêmeas de linhagem isogênica, em número suficiente para que haja garantia das análises estatísticas dos resultados, sem excessos que violem os “Princípios Éticos da Experimentação Animal” (COBEA, 1996). Também estipula a via de administração a ser utilizada, doses e duração do tratamento, tendo como base os recomendados para uso do fitoterápico em humanos. Além das diretrizes estabelecidas pela OECD, que estabelece protocolos experimentais para utilização da dose e via de administração.

Diante do exposto, várias são as espécies de plantas que estão presentes na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Rennis), uma lista com 71 espécies que apresentam potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e gerar produtos de interesse ao SUS e ao Ministério da Saúde (BRASIL, 2009). A *Pilocarpus microphyllus* não está na lista das 71 espécies com potencial de virar fitoteráico, mas o uso de seu princípio ativo pilocarpina é permitido na Portaria nº 71, de 29 de maio de 1996.

O Brasil tem se preocupado em estabelecer diretrizes que objetivam o emprego de plantas medicinais ou de medicamentos que as contenham dentro dos requisitos de segurança, considerando a política de medicamentos estabelecida com o uso racional de medicamentos. A criação de uma política de âmbito nacional para o uso das plantas medicinais e dos fitoterápicos foi resultado de uma luta que remonta à época anterior à criação do SUS, em que diversos autores, como pesquisadores, gestores, profissionais de saúde e usuários tiveram papel fundamental (BRASIL, 2006).

Assim, os testes de toxicidade reprodutiva, que constituem objetivos desta pesquisa, foram realizados para determinar os efeitos diretos do óleo essencial de *P. microphyllus* sobre o processo de reprodução de mamíferos roedores.

Esta tese é constituída de dois capítulos, sendo que o primeiro artigo será submetido à publicação de acordo com a área ZOOTECNIA / RECURSOS PESQUEIROS na Brazilian Archives of Biology and Technology, ISSN 1678-4324 – Qualis B2, e o segundo capítulo será submetido à publicação na Anais Da Academia Brasileira De Ciências (ABC), ISSN 1678-2690 – Qualis B1.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth

Entre as espécies de plantas medicinais nativas e cultivadas no Brasil, produtoras de compostos bioativos de interesse mundial destacam-se aquelas que são popularmente conhecidas pelo nome de jaborandi (gênero *Pilocarpus*, família Rutaceae). Essa espécie é fonte de uma variedade de metabólitos secundários com potencial atividade farmacológica, tais como alcaloides, cumarinas, flavonoides e terpenos (SANTOS; MORENO, 2004). O jaborandi apresenta uma ampla distribuição pelo continente americano, estendendo-se da América Central até a América do Sul, já sendo descritas para este gênero 15 espécies (Quadro 1), das quais 13 são encontradas no Brasil, sendo 11 exclusivas desse território (SKORUPA, 2000).

O gênero *Pilocarpus* compreende espécies nativas encontradas do Norte ao Sul do Brasil. Dentre essas espécies, encontra-se a *P. microphyllus*, popularmente conhecida como jaborandi, é uma planta altamente ramificada, arbustiva e que apresenta altura média de dois metros, com folhas (Figura 2A) compostas medindo cerca de 40 cm

quando adultas e folíolos coriáceos, de forma lanceolada. As flores (Figura 2B) do jaborandi (*P. microphyllus*) são pequenas e arranjadas em ráculos (cachos) compactos. Os frutos são dispostos em cachos brancos contidos em cápsulas de córtex acizentado e lisos (MARQUES; COSTA, 1994).

Quadro 1 – Distribuição geográfica no Brasil das diferentes espécies do gênero *Pilocarpus*.

ESPÉCIES	OCORRÊNCIA	REFERÊNCIAS
<i>Pilocarpus microphyllus</i>	MA, PA, PI	SKORUPA, 1996
<i>Pilocarpus jaborandi</i>	BA, PE, CE	SKORUPA, 1996
<i>Pilocarpus riedelianus</i>	AL, PE, BA, ES, PB	SKORUPA, 1996
<i>Pilocarpus spicatus</i>	RJ, ES, BA, PE, PB, CE, SP	SKORUPA, 1996
<i>Pilocarpus trifoliolatus</i>	PA	SKORUPA E PIRANI, 2004
<i>Pilocarpus grandiflorus</i>	ES, BA, AL	SKORUPA, 2003
<i>Pilocarpus trachylophus</i>	MG, BA, PI, MA, CE	SKORUPA, 1996
<i>Pilocarpus pennatifolius</i>	BA, GO, MG, SP, PR, SC, RS, MT, MS, PE	SKORUPA, 1996
<i>Pilocarpus giganteus</i>	BA, MG, RJ, SP, ES	SKORUPA, 1996
<i>Pilocarpus peruvianus</i>	AC, RO, MT	SKORUPA, 1996
<i>Pilocarpus pauciflorus</i>	BA, SC, PR, SP, RJ, ES	SKORUPA, 2003
<i>Pilocarpus alatus</i>	PA; MA	SKORUPA, 1996
<i>Pilocarpus manuensis</i>	AC	SKORUPA, 1996
<i>Pilocarpus sulcatus</i>	BA; MG	SKORUPA, 1996
<i>Pilocarpus carajaensis</i>	PA	SKORUPA, 1996

Fonte: SKORUPA, 1996; SKORUPA 2003.

No Brasil, ocorre principalmente no leste da Amazônia e nas regiões do Centro-Sul e Nordeste, com vasta distribuição nativa no Piauí e Maranhão (MARQUES e COSTA, 1994).

Figura 2- Folhas (A) e flores (B) de Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), pertencente ao gênero *Pilocarpus* e família Rutaceae



Fonte: [http:// www.flickr.com](http://www.flickr.com)

P. microphyllus é uma das mais importantes espécies de plantas medicinais do Brasil, devido ao fato de suas folhas serem fonte da pilocarpina. Este alcaloide imidazol é produzido pela indústria farmacêutica e utilizado para tratar o glaucoma e xerostomia (GIL-MONTOYA et.al., 2016; LIMA et al., 2017).

Em um levantamento etnobotânico realizado por Montelos e Pinheiro (2007), em uma comunidade tradicional do Estado do Maranhão, descobriu-se que o suco de folhas de *P. microphyllus* foi usado para tratar doenças de pele. Maia et al. (2011) atribuem a esta espécie as atividades: indução de transpiração, constrição pupilar (miose), aceleração peristáltica, indução de salivação e no tratamento de bronquite, pele seca, febre, acne, perda de cabelo e seborréia.

Nas últimas três décadas, esta espécie foi considerada uma das mais importantes na flora brasileira para a produção de medicamentos. Existem cerca de 15 milhões de plantas jaborandi no cultivo e estas produzem cerca de 10.000 kg de folhas por ano (PINHEIRO, 2002 , 2006). É importante notar que *P. microphyllus* tem alcalóides que são vistos como fontes promissoras na busca de agentes antiparasitários (VÉRAS et al, 2012.).

A partir de espécies de jaborandi (*Pilocarpus* sp) já foram identificadas as estruturas dos seguintes alcalóides: pilocarpina (1), isopilocarpina (2), pilocarpidina(3), isopilocarpidina (4), pilosina (5), isopilosina (6), epiisopilosina (7), epiisopiloturina (8), 13- nora-7(11)-dehidro-pilocarpina (9), *N,N*-dimetil-5-metoxi-triptamina (10), *N,N*-dimetiltriptamina (11), plastidesmina (12), (1*H*)-4-metoxi-2-quinolone (13) e dictamina (14). Alguns deles já tiveram as suas estruturas determinadas por Ressonância

Magnética Nuclear-RMN, porém ainda não possuem atividade farmacológica descrita, podendo ser promissores como o objetivo da pesquisa para a medicina humana e veterinária (ANDRADE et al., 2008; SANTOS; MORENO, 2004).

Por meio de pesquisas realizadas através da técnica de cromatografia gasosa já foram detectados 24 compostos presentes nos óleos essenciais de *P. microphyllus*, dentre os quais encontram-se monoterpenos e sesquiterpenos. Esses compostos encontrados foram: alfa pineno, limoneno, trans-beta-omiceno, delta eleneno, alfa cubeneno, alfa copaeno, beta bouboneno, germancreno D, beta elemeno, trans-cariofileno, alfa gaieno, alfa humuleno, aromadendreno, gama cadieneno, isoleveno, tridecanona, biciclogermacreno, delta guaineno, beta cadineno, Germancreno B, Dehidroaromadendreno, beta guaieno, beta guaineno e pentanodec-2-ona. Dentre estes, os compostos majoritários são γ -cadineno (23,53%) seguido de trans-cariofileno (21,43%) e tridecanona 16,15% (SILVA, 2017).

A exploração do jaborandi é responsável por uma grande massa de recursos financeiros nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Em 2013, movimentou em torno de 291 toneladas no norte e nordeste brasileiro perfazendo aproximadamente R\$ 1,2 milhões de um total de R\$ 4,5 bilhões referentes ao extrativismo vegetal realizado no Brasil naquele ano (IBGE, 2013).

2.2 .Toxicidade reprodutiva e teratogenicidade

A toxicologia do desenvolvimento é uma expressão relativamente recente encontrado dentro da toxicologia reprodutiva (UDO, 2012). No entanto, ela tem suas raízes relacionadas à teratologia, termo utilizado antigamente para denominar alterações de ordem estrutural no conceito (GÓRNIAK et al., 2008), decorrentes de perturbações do desenvolvimento embrionário ou fetal (UDO, 2012). O aparecimento de efeitos embriotóxicos e fetotóxicos induzidos por substâncias diversas pode resultar da interação destas com outros fatores que incidem no conjunto mãe-placenta-feto, interferindo no estado nutricional do feto (MELLO, 2007).

De modo geral, a toxicologia reprodutiva dedica-se ao estudo de fatores que possam alterar o sistema reprodutor, o desenvolvimento do embrião e feto e o desenvolvimento pós-natal da prole (SANTOS, 2011). Assim sendo, o ciclo reprodutivo não versa apenas na concepção, prenhez e nascimento, mas tem início com a produção de gametas nos genitores (no período pré-natal), continuando pela fertilização e

desenvolvimento embrionário e fetal, nascimento e desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual, quando o descendente adulto torna-se capaz de procriar (MELLO, 2007).

Testes de toxicidade reprodutiva são realizados para determinar os efeitos diretos de uma substância química sobre o processo de reprodução dos mamíferos. Devido à complexidade dos processos que envolvem a fertilidade e desenvolvimento é inevitável que distúrbios fisiológicos advindos da exposição a agentes químicos possam em muitos casos exercer um efeito deletério indireto sobre esses processos (LEMÔNICA, 2001).

O termo teratogenicidade provém do grego *teratos*, que significa monstro. O sentido original da palavra refere-se a malformações anatômicas macroscópicas, embora atualmente tenha se expandido sua definição para englobar anomalias mais sutis como atraso intrauterino e distúrbios bioquímicos e psicomotores (LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001). Um agente teratogênico é qualquer agente que durante a vida pré-natal produz uma alteração permanente na morfologia e/ou fisiologia de mãe-placenta-feto. Este agente pode ser uma substância química, droga, processo infeccioso, exposição ambiental ou condição materna (SHEPARD, 1995).

Assim, as malformações não significam apenas anormalidades em tecidos, mas também anormalidades bioquímicas. Atualmente a teratologia também abrange as manifestações no retardo do crescimento, alterações funcionais e comportamentais e/ou morte da prole (UDO, 2012). As manifestações do desenvolvimento anormal podem ir desde um distúrbio funcional até a morte (FAVEIRO, 2006). Cada um dos sistemas em formação apresenta um período crítico específico em que se encontra mais suscetível ao agente e quanto maior for este período, maior também será a suscetibilidade (BERNARDI, 2014).

Dessa forma, o uso indiscriminado de plantas medicinais por gestantes é um problema de saúde pública, uma vez que as gestantes fazem o uso de plantas medicinais sem saber dos possíveis efeitos causados por esse tipo de terapia. Vale destacar que, os efeitos abortivos e teratogênicos se dão, principalmente no primeiro terço de gestação (RODRIGUES, 2011).

Levando-se em conta que os objetivos da avaliação da toxicidade reprodutiva e da teratogenicidade são os de evidenciar possíveis riscos de xenobióticos para a espécie humana e para animais domésticos, os testes são realizados, em sua maioria, em mamíferos como ratos e camundongos, que reúnem diversas características que os

tornam animais de escolha para os testes em laboratório, como: período curto de gestação, prole numerosa, útero com dois cornos nos quais os sítios de implantação têm distribuição regular, placenta tipo hemocorial, como no ser humano (MELLO; LANGELOH, 2006).

A gestação do rato dura de 21 a 23 dias, sendo dividida em três períodos: pré-implantação, abrange do 1° ao 5° dias de gestação, caracterizado pela formação do blastocisto e início da implantação; organogênico, do 6° ao 15° dias de gestação, havendo o término da implantação e período de formação dos tecidos e órgãos; fetal, do 16° ao 21° dias de gestação, no qual o feto já com os órgãos formados, inicia seu crescimento intrauterino, com maturação funcional dos órgãos (GRANCE, 2007). Já no período neonatal, que ocorre após o nascimento e se estende do 1° ao 21° dia (amamentação) ocorrem a maturação de receptores, diferenciação sexual do encéfalo, formação de sistemas enzimáticos (GEHLEN, 2003) e ganho de peso corporal, os quais podem sofrer prejuízos com a exposição a substâncias químicas. O período mais importante do desenvolvimento cerebral do rato ocorre nas duas primeiras semanas pós-natais (CASTRO, 2006).

Para cada estrutura formada, existem picos de susceptibilidade ao aparecimento das malformações (UDO, 2012). Essas malformações congênitas constituem distúrbios de desenvolvimento presentes ao nascimento e que surgem no período embrionário e incluem todas alterações de ordem estrutural, funcional ou metabólica, que causam anomalias físicas ou mentais ao indivíduo (CASTRO et al, 2006; HOROVITZ; LLERENA JUNIOR; MATTOS, 2005). No rato, por exemplo, o ácido acetilsalicílico só é capaz de produzir fenda palatina se o feto for exposto entre o 10° e 16° dias de gestação, período em que se forma o palato. Quanto maior for o período de formação de um determinado sistema maior será o risco de seu desenvolvimento ser afetado por um determinado agente (GEHLEN, 2003).

Como todos os efeitos tóxicos, os efeitos teratogênicos geralmente são dose-dependentes (GEHLEN, 2003), logo, aumentando a dose do fármaco, deve-se verificar um aumento da toxicidade. Dessa forma, o feto pode apresentar um efeito mais grave, como o óbito, efeito letal (GORNIAK et al., 2008).

A causa da maioria das malformações ainda é desconhecida, porém, as anomalias cromossômicas (fatores genéticos), os teratógenos (fatores ambientais) e a herança multifatorial (genética e ambiental) são agentes etiológicos melhor identificados (GUERRA, 2006). Para ser considerado um teratógeno, o agente tóxico

deve produzir seus efeitos embriotóxicos em níveis de doses que não provoquem toxicidade para a mãe, pois se houver toxicidade materna, a dismorfogênese poderá decorrer do efeito primário tóxico materno, o que não é considerado teratogenicidade (GORNIAK et al., 2008).

Os danos reprodutivos podem ser agrupados nas principais classes: (1) morte do conceito, (2) malformações, (3) retardo de crescimento intrauterino, e (4) deficiências funcionais, incluindo-se aqui o retardo mental. Esses danos podem tanto ter uma causa genética como ambiental e, muitas vezes, uma combinação das duas (etiologia multifatorial) (SCHÜLER-FACCINI; PIRES, 2002)

Dentro dos grupos que causam danos reprodutivos, estão as plantas. Muitas delas são utilizadas de forma indiscriminada e algumas são prejudiciais à prenhez nas diversas espécies, incluindo a humana. Dentre as plantas mais recorrentes são citadas a bétula (*Betula alba*), a cânfora (*Cinnamomum camphora*), o cedro (*Cedrela brasiliensis*), a erva-doce (*Pimpinella anisum*), ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*), jasmim (*Jasminum officinalis*), manjeriço (*Origanum basilicum*), manjerona (*Majorana hortensis*), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) e algumas espécies de copaíba (*Copaifera* sp.), devendo-se evitar o consumo em gestantes, especialmente nos primeiros meses de gravidez (CASCON; GILBERT, 2000; MONTANARI, 2008; MULLER et al, 2009).

2.3 Anatomia do aparelho reprodutor de machos

Os ratos são modelos biológicos consolidados e difundidos mundialmente, úteis para os mais variados tipos de pesquisas, devido ao vasto conhecimento da anatomia e fisiologia destes animais, além da semelhança morfofisiológica com a espécie humana (GRAHAM; NADEAU, 2014; PAGLIARANI et al., 2014; RAUNIG et al., 2011).

A inervação do pênis é autonômica (vias simpáticas e parassimpáticas) e somática (vias sensoriais e motoras). A partir do plexo pélvico, as inervações simpática e parassimpática confluem, formando o nervo cavernoso, que adentra os corpos cavernosos e esponjosos para controlar os eventos neurovasculares durante a ereção e intumescência. Os nervos somáticos são responsáveis pelas sensações e pela contração dos músculos bulbo cavernoso e isquiocavernoso (DEA; LUE, 2005).

Os testículos, órgãos do sistema reprodutor masculino, são as principais glândulas desse sistema e podem ser divididos, funcional e anatomicamente, em duas partes: tecido intersticial (células de Leydig) e túbulos seminíferos (células de Sertoli), responsáveis pela esteroidogênese (produção de testosterona) e pela espermatogênese (produção de espermatozoides), respectivamente. (ANTUNES-RODRIGUES; FAVARETTO, 1999). A espermatogênese necessita de uma rede de interrelações neuroendócrinas com funções endócrinas, parácrinas e autócrinas (ROSER, 2008). Em ratos, estas geram um ciclo que apresenta 55,6 dias onde ocorrem as diferenciações das células germinativas do epitélio seminífero (FRANÇA, 2005). Esses espermatozoides ao serem produzidos são lançados nos epidídimos onde ficam armazenados (18 a 24 horas) e adquirem a capacidade de motilidade, embora várias proteínas inibitórias no líquido do epidídimo ainda impeça a motilidade final até depois da ejaculação. Ao saírem do epidídimo, os espermatozoides caem no canal deferente onde ficam armazenados até o momento da ejaculação (BUFALO, 2007).

A fertilidade masculina depende da produção de milhões de espermatozoides por ejaculado. Para tal, há necessidade de um processo único, altamente complexo e ordenado, que dura certa de seis a nove semanas e depende de fatores parácrino, autócrinos e endócrinos (O'DONELL et al, 2008). A próstata é a maior glândula acessória desse sistema (DIAZ et al, 2010). A sua função é produzir fluidos que contribuam para a formação do ejaculado e elementos como zinco, ácido cítrico , prostaglandinas, frutose e enzimas que contribuem na fertilidade do espermatozoide (RISBRIDIER; TAYLOR, 2006).

CAPÍTULO I*

*Apresentado segundo normas da revista *Brazilian Archives of Biology and Technology*

Análise do desenvolvimento inicial da prole de ratas tratadas com óleo essencial de Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth)

Efeito do Jaborandi em progênes de ratos

Resumo

Pilocarpus microphyllus Stapf ex Wardlew (Rutaceae), popularmente conhecida como jaborandi, é uma planta nativa das regiões norte e nordeste do Brasil, muito utilizada na medicina popular para tratar diversas doenças. Assim este estudo avaliou o desenvolvimento pós natal de ratos, após administração do OE-Pm nas doses de 25, 50 e 100mg/kg e tween 80 (1%) como controle, por via oral durante a prenhez e lactação, verificando a presença ou não de anomalias e malformações externas. Os resultados indicaram que os parâmetros: quantidade de filhotes, peso ao nascer (g), deslocamento dos pavilhões auriculares (dias) e surgimento de pelos (dias) não foram alterados significativamente. Porém, quanto ao tempo de: abertura palpebral ocular bilateral, abertura do canal vaginal, descida dos testículos e separação prepucial, os resultados indicaram um retardo significativo nas proles ratos tratados com o OE-Pm. Com base nesses achados, pode-se inferir que o óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* apresenta efeitos tóxicos durante a lactação para o desenvolvimento inicial de ratos. Foi capaz e interferir no desenvolvimento pós-natal da prole.

Palavras chaves: toxicidade; lactação; prenhez; prole

INTRODUÇÃO

A toxicologia reprodutiva dedica-se ao estudo de fatores que possam alterar o sistema reprodutor, o desenvolvimento do embrião e do feto e o desenvolvimento pós natal da prole¹. De modo específico, têm-se a toxicologia do desenvolvimento, um termo relativamente recente da toxicologia reprodutiva, ligada a perturbações do desenvolvimento embrionário ou fetal, estudando suas anomalias e malformações². Por isso, exposição pré-natal ou intrauterina e pós-natal, por meio do leite materno a xenobióticos, pode produzir alterações, muitas vezes irreversíveis, no desenvolvimento em ambos os sexos³. É provável que metabólitos de óleos essenciais atravessem a placenta devido ao íntimo, mas não direto, contato entre o sangue materno e embrionário ou fetal. Substâncias lipofílicas podem migrar por difusão passiva entre estas duas circulações e atingir níveis equivalentes entre o sangue materno e fetal. Em seguida são biotransformadas em compostos polares e podem se acumular no concepto⁴.

Os compostos naturais possuem vasta variabilidade qualitativa e quantitativa nos seus constituintes químicos, o que se reflete em diferentes mecanismos de ações toxicológicas e farmacológicas e isso pode repercutir na eficácia e segurança dos produtos naturais^{5,6}. As plantas medicinais e seus derivados podem ser tão eficientes quanto os medicamentos sintéticos. Entretanto, a transformação da planta em medicamento requer estudos que visam garantir a integridade da entidade química, a manutenção das suas propriedades farmacológicas e sua segurança, critério muitas vezes negligenciado pela medicina popular em virtude da falsa ideia de que esses produtos possam ser inócuos⁶. Atualmente, existe no mundo um apelo ao consumo de produtos naturais, embora suas indicações terapêuticas possuam fundamentação apenas em hábitos e costumes e as propriedades farmacológicas a eles atribuídas ainda não tenham

comprovação se quer em testes pré-clínicos.^{7,8,9,10,11}

Várias espécies da família Rutaceae são importantes devido ao seu valor econômico para alimentação, ornamentação e usos medicinais. O gênero *Pilocarpus*, pertencente a essa família, encontra-se distribuído largamente pela América do Sul e América Central. A maioria das espécies desse gênero são nativas do Brasil, onde o jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf) encontra amplas aplicações^{12,13}. A partir de espécies de *Pilocarpus* sp, já foram identificadas as estruturas de diversos alcaloides, como: pilocarpina, isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina, 13-nora-7-dehidropilocarpina, *N,N*-dimetil-5-metoxi-triptamina, *N,N*-dimetiltriptamina, plastidesmina, (1*H*)-4-metoxi-2-quinolone e dictamina, os quais possuem diversas atividades biológicas, entre elas, efeito antioxidante, antifúngico, contra o glaucoma e a xerostomia, galactagogas, contra a forma jovem e adulta do parasita *Schistosoma mansoni*. Na espécie *P. microphyllus* destaca-se o princípio ativo pilocarpina, um alcaloide dentre os isolados das espécies de jaborandi que pode agir sobre o sistema nervoso autônomo como um fármaco colinérgico direto, estimulando o sistema parassimpático, com efeitos sobre a bexiga, canais lacrimais, glândulas sudoríparas, glândulas salivares e outros órgãos. Este alcaloide é a droga de eleição para o tratamento de glaucoma e também na xerostomia, esta causada pela radioterapia ou quimioterapia nos cânceres de cabeça e pescoço.¹³ Por ser de origem natural, as propriedades tóxicas das plantas são muitas vezes esquecidas favorecendo o uso de modo abusivo. Mesmo para aquelas espécies com documentação científica que comprove seus efeitos terapêuticos, a toxicidade costuma ser desconhecida ou pouco explorada.^{14,8,15} No Brasil, a toxicidade de plantas medicinais é pouco investigada.¹⁶ Desta forma é necessário conhecer as características farmacológicas e toxicológicas, posologia e aspectos clínicos dessas substâncias, evitar a propagação de informações equivocadas e aprimorar os métodos de produção, controle de qualidade e de fiscalização para que ocorra realmente segurança na utilização de produtos naturais.^{7,9,17} Assim, em função do uso da *Pilocarpus microphyllus* para diversos fins terapêuticos, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito no desenvolvimento pós natal da progênie de ratas tratadas com o óleo essencial de jaborandi em diferentes doses.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

O óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* foi fornecido pela empresa Phytobios, empresa brasileira voltada para o desenvolvimento e comercialização de tecnologias baseadas em Biodiversidade por meio de pesquisa, licenciamento, apoio regulatório e gestão de inovação. Uso desta planta para esta pesquisa foi cadastrada no SISGEN, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 com o número de cadastro - AE07055.

ANIMAIS

Utilizaram-se ratos Wistar adultos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí-UFPI e foram mantidos em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado, contendo maravalha, com água e ração *ad libitum*, em regime de luminosidade com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais- CEUA da UFPI sob o nº 289/17.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais, num total de 28 ratas (4 grupos de 7 animais) foram acasaladas com machos na proporção de 2 fêmeas para um macho. A identificação da prenhez foi realizada através do esfregaço vaginal matinal para detecção de espermatozoides e contado como dia 0 de gestação, onde 3 grupos destas fêmeas prenhes, foram tratados uma vez ao dia por via oral com óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* (OE- Pm) nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg e o grupo

controle com solução de tween 80 a 1% em água destilada (utilizada para dissolver o óleo), utilizando uma sonda gástrica. O tratamento teve início no 8º dia de prenhez, que corresponde ao início do período de pós-implantação do feto, nesta fase ocorre a organogênese da espécie e consequente formação esquelética e visceral, sendo interrompida somente no dia do nascimento da progênie (21^o±1 dia de prenhez) e continuado dia seguinte ao parto até o 21º dia de lactação que corresponde ao desmame. Durante a gestação foram também observados a presença de alterações comportamentais de toxicidade como diarreia, piloereção, tremores, salivação, convulsões e outros sinais que pudessem surgir. Para permitir o adequado controle do nascimento dos filhotes, no 18º dia de prenhez, as fêmeas foram separados e mantidos em gaiolas individuais, inspecionados duas vezes ao dia até o parto, para anotações sobre o nascimento da prole (1º dia pós-natal). Os filhotes foram desmamados no 21º dia pós-natal e colocados em novas gaiolas. Desde o nascimento os filhotes foram observados, duas vezes ao dia, quanto às características de evolução como a massa corporal, deslocamento dos pavilhões auriculares, surgimento de pelos, abertura palpebral ocular bilateral, abertura do canal vaginal, descida dos testículos e separação prepucial. Ao final das análises os ratos foram eutanasiados com lidocaína e Tiopental sódico de acordo com as normas do Conselho Federal de Medicina Veterinária (Resolução 37/CFMV, de 2018).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram avaliadas pelo teste Kolmogorov-Smirnov quando à distribuição normal dos dados. Os dados paramétricos foram analisados pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni para comparação das médias e o teste de Kruskal-Walis foi utilizado para analisar os dados não paramétricos. Os resultados foram expressos em médias ± erro padrão da média e analisados no programa IBM Statistical Package for the Social Sciences versão 20. O nível de significância adotado foi de 95% de probabilidade (P<0,05).

RESULTADOS

- **Análise do desenvolvimento geral das progênies**

Os resultados mostraram que a quantidade de filhotes nascidos das ratas tratadas com OE- Pm não diferiu do grupo controle, nem houve diferença significativa entre as doses dos grupos tratados com OE-Pm durante gestação e lactação. Nas características gerais, com relação ao peso ao nascer (g), deslocamento dos pavilhões auriculares, surgimento de pelos, não houve alteração significativa quando comparados os grupos tratados com o óleo e o grupo controle. Os ratos do grupo tratados com OE-Pm 100 mg/kg mostraram uma diminuição significativa do tempo para abertura palpebral ocular bilateral quando comparados com os ratos do grupo tratado com OE-Pm 25 mg/kg (Tabela 1).

Tabela 1 – Tempo médio (dias) para o aparecimento das características de desenvolvimento geral da progênie exposta ao Tween 80 1% (CN), 25mg/kg de OE-Pm (C25), 50mg/kg de OE-Pm (C50), 100mg/kg de OE-Pm (C100) durante a gestação e lactação.

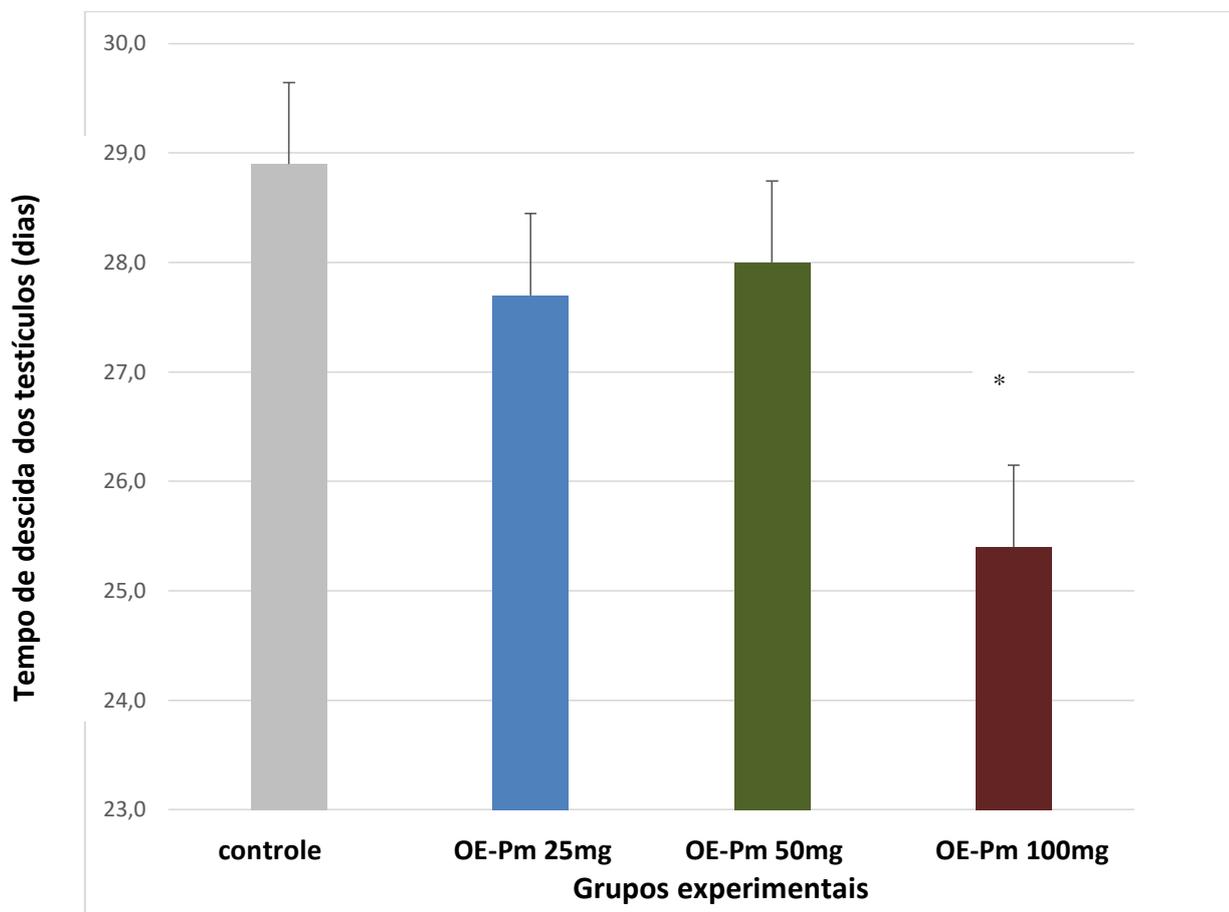
Características	CN	C25	C50	C100	p
	Média ± EPM	Média ± EPM	Média ± EPM	Média ± EPM	
Quantidade de filhotes	10,4 ± 4,0	9,6 ± 2,1	8,9 ± 1,3	10,4 ± 1,5	0,593
Peso ao nascer (g)	6,0 ± 0,7	6,7 ± 1,3	6,0 ± 0,4	5,5 ± 0,5	0,106
Deslocamento dos pavilhões auriculares	16,9 ± 1,1	15,6 ± 1	16,4 ± 1,7	15,4 ± 1,1	0,130
Surgimento de pelos	8,0 ± 0,6	6,6 ± 1,3	6,7 ± 0,8	7,0 ± 1,4	0,078
Abertura palpebral ocular bilateral	14,9 ± 1,2	15,0 ± 1,2	14,4 ± 1,3	13,0 ± 1,7*	0,044

Valores expressos como médias ± erro padrão da média (n=7 animais/grupo). *p<0,05 comparado com o OE-Pm 25 mg/kg, pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

- **Análise das características sexuais das progênies**

A figura 1 demonstra o tempo para descida dos testículos nos grupos controle e tratados durante gestação e lactação. Foi observado uma redução significativa no tempo de descida dos testículos em ratos que receberam OE-Pm na dose de 100mg/kg quando comparada com os demais grupos.

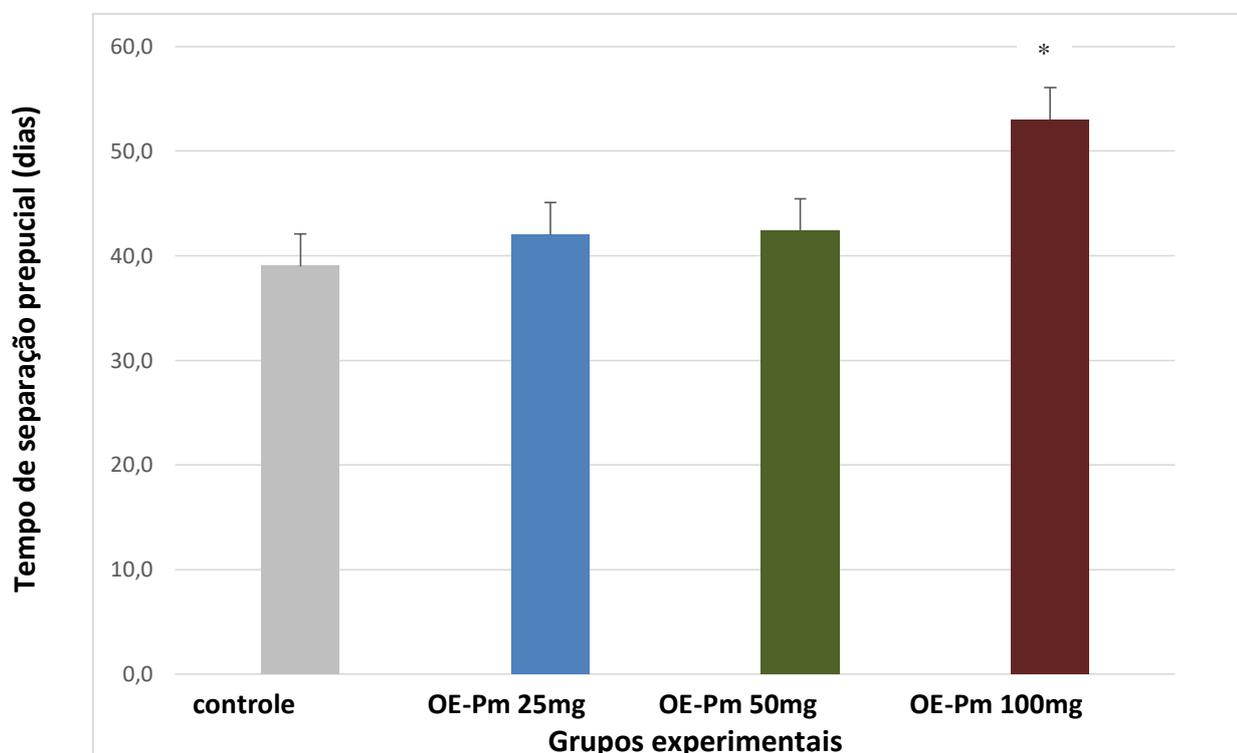
Figura 1 – Tempo decorrido para descida dos testículos em ratos exposto durante a gestação e lactação ao OE-Pm e a Tween 80 a 1%.



Os resultados expressam as média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle e grupos OE-Pm 25 e 50 mg/kg, por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

A administração de óleo essencial de *P. microphyllus* na dose de 100 mg/kg na gestação e lactação das progenitoras aumentou significativamente o tempo de separação prepucial dos filhotes machos, quando comparados com animais do grupo controle, assim como em relação aos tratados com óleo nas doses de 25 e 50mg/kg (Fig 2).

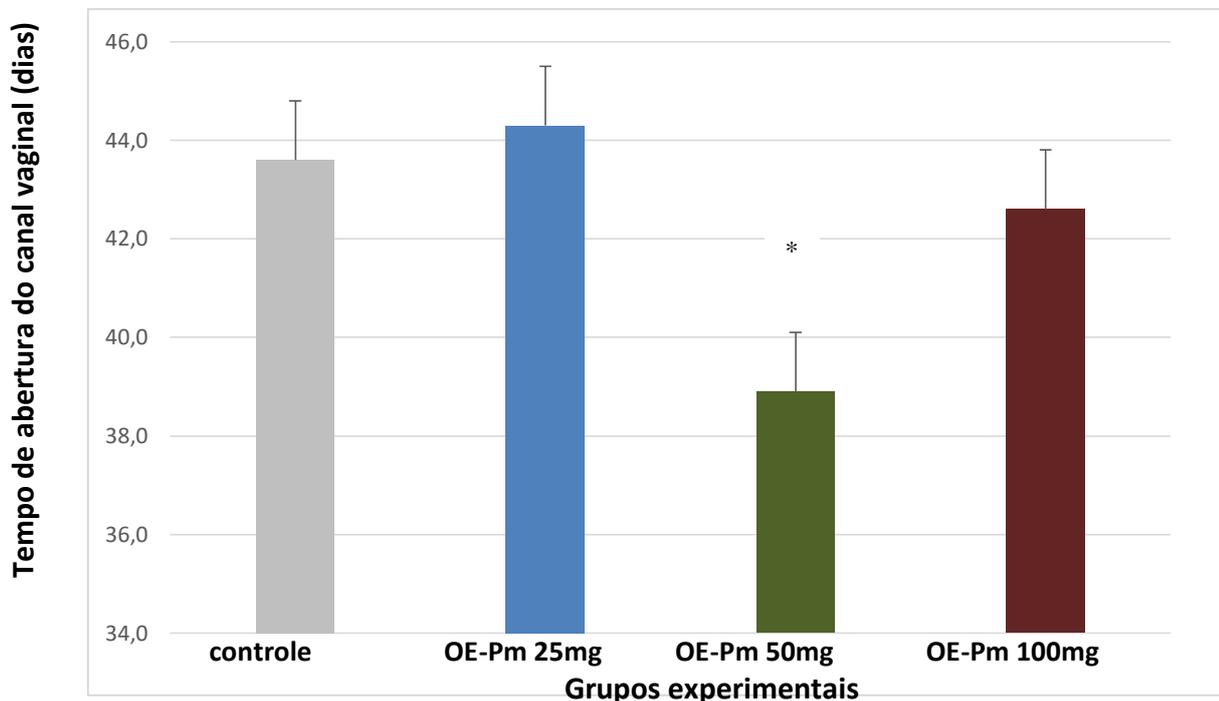
Figura 2 – Tempo decorrido para separação prepucial de progênie, cujas progenitoras foram tratadas com tween 80 ou OE-Pm, em diferentes concentrações, durante a gestação e lactação.



Os resultados expressam as média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle e grupos OE-Pm 25 e 50 mg/kg, por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

Os resultados da Figura 3 indicam que a dose de 100 mg/kg de OE-Pm reduziu significativamente o tempo de abertura do canal vaginal dos filhotes fêmeas de ratas tratadas durante a gestação e lactação, quando comparado com o grupo tratado com OE-Pm 25 mg/kg.

Figura 3 – Tempo decorrido para abertura do canal vaginal em ratas tratadas com tween 80 1% e OE-Pm nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg.



Os resultados expressam as média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo 25 mg/kg, por ANOVA, seguida do teste de Bonferroni.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento físico pós-natal é medido não só pelo crescimento, mas por indicadores físicos, característicos da maturação progressiva, que vão se estabelecendo, progressivamente, com a idade do animal²⁷. A observação da presença ou ausência dos parâmetros de desenvolvimento físico é realizada de acordo com a idade do filhote e por determinado número de dias consecutivos até o aparecimento do parâmetro estudado em todos os filhotes avaliados²⁸. De acordo com os resultados obtidos nestes estudos, a quantidade de filhotes nascidos e o peso ao nascer das progênes de ratas tratadas com tween 80 e OE-Pm não se alteraram significativamente entre os grupos tratados. Isso mostra que a fertilidade e a gestação das ratas não foram influenciadas pelo tratamento com o óleo o que pode ser explicado pelo fato de que a exposição materna a agentes tóxicos no período fetal pode levar a anormalidades morfológicas menores e funcionais, sem necessariamente interferir no peso e número da prole; o que é

sustentado por autores^{20,21,22} que observaram a exposição de fêmeas a agentes químicos durante a prenhez e a lactação pode causar alterações de acordo com a ocorrência de períodos críticos no desenvolvimento animal.

No desenvolvimento dos descendentes em relação ao surgimento de pelo e deslocamento dos pavilhões auriculares, observou-se que o óleo não interferiu significativamente nessas características. É importante considerar que a progênie alimenta-se estritamente do leite materno até 8 ± 2 dias pós-natal e, a partir desse período, já consegue se alimentar também de ração, reduzindo mais ainda os níveis de exposição ao óleo.²⁴ Apesar do óleo não ter interferido no tempo de deslocamento dos pavilhões auriculares e no surgimento de pelos, ele interferiu no desenvolvimento de seus descendentes em relação ao período de abertura palpebral ocular bilateral (dias), onde se observou uma diminuição nesse tempo, ou seja, as progênies tratadas com OE-Pm na maior dose conseguiram abrir os olhos precocemente. Isso pode resultar em uma exposição maior da visão, ainda não completamente formada ou imatura ao meio externo e trazer consequências oculares desde a diminuição da visão até possíveis danos irreversíveis, pois a maturação do sistema visual continua após o nascimento. Embora a via de exposição tenha sido alterada de membrana feto-placenta para leite materno, indicando uma possível redução nos níveis de exposição aos componentes do óleo, o tratamento com OE-Pm apresentou toxicidade fetal e pós-natal.

O estudo mostrou que a exposição gestacional e lactacional ao OE-Pm interferiu nas características sexuais das progênies. O tempo de descida dos testículos foi reduzido após exposição do OE-Pm na dose de 100 mg/kg quando comparado com o grupo controle e aos grupos expostos ao OE-Pm na dose de 25 e 50 mg/kg. Porém o óleo aumentou o tempo de separação prepucial na maior dose quando comparado com o grupo controle e grupos expostos ao óleo na dose de 25 e 50mg/kg.

Para que haja uma boa produção espermática, a temperatura testicular deve estar abaixo da temperatura corpórea e em decorrência disso, ocorre o processo de descida do testículo da cavidade abdominal para o escroto, que em grande parte dos mamíferos domésticos acontece no período fetal ou logo após o nascimento e é realizada pelo gubernáculo.²⁵ Este que orienta o testículo em direção ao canal inguinal e subsequente ao escroto. Esses dois eventos, descida testicular e separação prepucial obedecem também ao efeito direto da testosterona e indiretamente ao aumento de liberação de LH pela hipófise²⁵.

Para que ocorra o deslocamento testicular para a bolsa escrotal e separação prepucial não é um simples mecanismo, numa só fase, mas pelo contrário, é influenciado por processos complexos, que podem ser mecânicos e hormonais. Algum agente contido no óleo parece ter um efeito sobre esses mecanismos e possui sensibilidade diferente aos eventos descida dos testículos para bolsa escrotal e separação prepucial. Além disso, a exposição da progênie ao OE-Pm compreendeu um período crítico na maturação sexual desses ratos, pois desta forma, ocorreu uma provável interferência na idade à puberdade dos machos, uma vez que a produção espermática apresenta relação direta com os eventos decorridos durante o período crítico de desenvolvimento testicular em ratos e mudanças experimentais durante este período podem alterá-las.²⁶

De acordo com os resultados, o tempo de abertura do canal vaginal da progênie exposta ao OE-Pm 50mg/kg, diminuiu de forma significativa quando comparado a progênie exposta ao OE-Pm 25mg/kg. Nas ratas o único sinal externo de puberdade é a canalização da vagina, que é inicialmente imperfurada e mais tarde (por volta de 30 dias pós natal) torna-se aberta em consequência da estimulação estrogênica. A abertura do canal vaginal ocorre um dia depois do primeiro pico pré-ovulatório de gonadotrofinas²⁷. Esses resultados sugerem possível interferência dos compostos do óleo com fatores endócrinos, fatores esses que indicam o OE-Pm como uma planta com possível ação estrogênica, ou seja, fitoestrogênica. Desta forma, pode-se inferir que o óleo essencial de jaborandi na dose de 50mg/kg interferiu na puberdade das ratas, pois a abertura do canal vaginal corresponde ao período de crescimento e maturação dos oócitos nos ovários, culminando no primeiro ciclo reprodutivo, e ocorre de um a dois dias após a abertura do canal vaginal.²⁸

O tempo médio para a abertura do canal vaginal e para a descida bilateral dos testículos até o escroto são eventos hormônio-dependentes, portanto a ocorrência de alterações na produção hormonal pode repercutir no aparecimento dessas características sexuais.²⁹

CONCLUSÕES

A administração de óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* durante o período gestacional e lactacional resultou em alteração no desenvolvimento geral da progênie e alterou o tempo de maturidade sexual masculina e feminina, demonstrado através da redução do tempo de descida dos testículos para bolsa escrotal e aumento do tempo para separação prepucial.

REFERÊNCIAS

1. Santos, TR. Desenvolvimento neonatal de crias de ratas Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1979) tratadas com o flavonóide ipriflavona durante a lactação plena. Dissertação (Mestrado)- Pós Graduação em Ciências Biológicas, Juiz de Fora- Minas Gerais. 2011.
2. Udo, MSB. Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição pré-natal ao fipronil na prole de ratas Wistar. 2012. 146f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
3. Epa- Enviromental Protection Agency. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assesment. Federal; 1996 Register 61 (212): 56274-56322
4. Burfield T. Safety of essential oils. The International Journal of Aromatherapy. 2000; v.10, n.1, 14p.
5. Feher M.; Schumidt J.M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. Journal of Chemical Information and Computer Science, 2003; v. 43, p. 218-227.
6. Toledo ACO.; Hirata LL.; Buffon MCM.; Miguel MD.; Miguel OG. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. Revista Lecta Bragança Paulista, 2003. v. 21, p. 7- 13.
7. Veiga Júnior VF, Maciel MAM, Pinto AC. Plantas medicinais: cura segura? Quim Nova. 2005;28(3):519-28.
8. França ISX, Souza JA, Baptista RS, Britto VRS. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. Rev Bras Enferm. 2008;61(2):201-8
9. Seeff LB. Herbal Hepatotoxicity. Clin Liver Dis. 2007;11(3):77-96.
10. Silveira PF, Bandeira MAM, Arrais PSD. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(4):618-26.
11. Oliver J. El consumo de hierbas medicinales como causa de hepatotoxicidad. Salud Ciênc. 2010;17(8):775-7.
12. Sabá, RT, Lameira, OA; Luz, JMQ; Gomes, APR; Innecco, R. Micropropagação do jaborandi. Horticultura Brasileira.2002. v. 20, n.1, p. 106-109.
13. Santos, AP.; Moreno, PRH. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. Revista brasileira de ciências farmacêuticas.2004. v. 40, n. 2, p. 116-137.
14. Turolla MSR.; Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2006 v. 42, n. 2, p. 289-306.
15. Ouedraogo M.; Baudoux T.; Stevigny C.; Nortier J.; Colet JM.; Efferth T.; Qu F.; Zhou J.; Chan K.; Shaw D.; Pelkonen O.; Duez P. Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. Journal of Ethnopharmacology, 2012. v. 140, p. 492-512.
16. Ferreira PMP, Carvalho AFFU, Sousa DF, Magalhães JF, Martins AR, Martins MAC, Queiroz MGR. Water extract of *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach. Rev Eletr Pesq Med. 2007;1(4):45-57
17. Jordan SA.; Cunningham DG; Marles RJ. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. Toxicology and Applied Pharmacology. 2010;v. 243, p. 198-216
18. Cano TM. Efeitos deletérios e teratogênicos da exposição ao mercúrio - Revisão da literatura Deleterious and teratogenic effects of mercury exposure -literature review; Rev Med Saude Brasilia 2014; 3(3):288-300

19. Mello, JRB, Mello FB, Langeloh A. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo Aloe ferox, Quassia amara, Cynara scolymus, Gentiana lutea, Peumus boldus, Rhamnus purshiana, Solanum paniculatum e Valeriana officinalis Lat. Am. J. Pharm. 2009. 28 (1): 183-91
20. Kimmel C. Current approaches to risk assessment for developmental neurotoxicology. In Slikker W, Chang L. Handbook of Developmental Neurotoxicology. San Diego: Academic Press. 1998, 675 – 685.
21. Chelonis J, Flak, R, Baldwin R, Blake B, Paule M. Developmental aspects of timing behavior in children. Neurotoxicology and Teratology. 2004; 26: (3)461–476.
22. Costa L, Aschner M, Vitalone A, Syversen T, Soldin O. Developmental neuropathology of environmental agents. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2004; 44:87-110.
23. Oliveira, MS. avaliação da toxicidade do extrato etanólico da *Simarouba versicolor* sobre parâmetros reprodutivos de ratas wistar: estudo *in vivo* e *in vitro*. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, 2013.
24. Muller, JBBS, Fernandes, RM , Batista, MCS , Moura, ER , Silva, RVP , Ferreira-Filho ES , Oliveira, RCM and Fernandes, MZLCM. Studies of *Copaifera luetzelburgii* Harms in reproductive pharmacology: In vivo and in vitro approaches.2013. Vol. 12(24), pp. 3864-3871.
25. Cunningham, JG. Tratado de Fisiologia Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 3 v.
26. Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. Evidence from Sertoli-cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cell produced during perinatal development . Endocrinology. 1988, v122, p. 787-794.
27. Soderteins P; Eneroth P. EFFECT of exposure to pups on maternal behavior, sexual behavior and serum prolactina concentrations in male rats. Journal of endrocrinology. 1984. v 102, p 115-119.
28. Spornitz UM, Socin CD, Dravid AA. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface ephitellium. 1999. Jan.254(1). 116-26.
29. Mably, TA, Moore, R.W., Peterson, RE. In útero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8 – tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. Toxicology and Appied Pharmacology, 1992.v114, p.97-107.

CAPÍTULO II*

* Apresentado segundo normas da revista Brazilian Academy of Sciences (ABC).

Efeito do óleo essencial de Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth) sobre o sistema reprodutivo de ratos Wistar

MOEMA SOUSA DE OLIVEIRA¹, INDIANNA LUA MENDES ARAÚJO²,
RAPHAEL BRISENO FROTA¹, AMILTON PAULO RAPOSA COSTA³

¹ Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí,
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 -
Teresina – PI, Telefone: (86) 3215-5753

² Acadêmica de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí, Bairro Ininga -
Teresina - PI -CEP: 64049-550

³ Departamento de Morfofisiologia Veterinária (DMV), Centro de Ciências Agrárias
(CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio
Portela, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 - Teresina – PI

Palavras-Chave: espermatozoides, reprodução, fertilidade

Toxicidade reprodutiva do óleo de Jaborandi em ratos adultos

Seção da Academia: Ciências Biológicas

Autor correspondente: Moema Sousa de Oliveira

Email: moema.sousa.oliveira@gmail.com

Resumo

A espécie *Pilocarpus microphyllus* popularmente conhecida como Jaborandi é uma planta com vários usos na medicina popular e sem estudos na área de toxicologia da reprodução. Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito do uso sub-crônico do óleo essencial de *P. microphyllus* na reprodução de ratos machos Wistar. Os 28 animais foram divididos aleatoriamente em: grupo controle com solução de Tween 80 a 1%, em água destilada, e três grupos com óleo nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, administrados por via oral por 60 dias, uma vez ao dia. Após o tratamento, foi realizada a eutanásia e os órgãos (testículos, epidídimos, próstata, vesículas seminais, rins, pulmões, baço, fígado, adrenais e coração) foram removidos, dissecados e pesados em balança analítica individualmente. Os espermatozoides da cauda do epidídimo foram analisados quanto à concentração, motilidade e vigor. Neste experimento verificou-se que o peso da próstata de ratos tratados com óleo na dose de 100mg/kg diminuiu significativamente com relação ao grupo controle, bem como a concentração espermática diminuiu na dose de 50 e 100mg/kg. Os resultados indicam que o óleo essencial de *P. microphyllus* tem possível interferência na fertilidade de ratos machos.

Introdução

Apesar de possuírem potencial curativo, as plantas medicinais, dependendo da dose, podem ser tóxicas ao organismo animal e humano, e até mesmo levar a óbito. O estudo toxicológico das plantas é alvo de pesquisas e investigações de muitos estudiosos desde antigas civilizações como a chinesa e a indiana. Dessa forma, os estudos toxicológicos têm a finalidade de avaliar a ideia errônea de que produtos fitoterápicos são isentos de efeitos tóxicos e que o uso popular de plantas medicinais serve como validação da eficácia de tais medicamentos (Lapa, 2007).

O principal problema no uso destes produtos de origem vegetal é a crença de que eles não podem apresentar eventos adversos (Rodrigues et al., 2011) e assim, toxicidade de plantas medicinais é um grave problema que diz respeito à saúde pública. Neste sentido, por exemplo, foi demonstrado que a administração oral de extrato metanólico da casca do caule da *Albizia lebbbeck* L. Beth (albízia) em ratos pode levar a um estado de infertilidade devido à interferência no processo de espermatogênese (Gupta et al, 2006).

As plantas medicinais no Brasil são consumidas sem nenhuma ou pouca comprovação dos seus constituintes ativos, divulgadas pelo comércio ou usuários. Em alguns casos, essas plantas são utilizadas para fins medicinais diferentes daqueles para as quais de fato ela tem utilidade (Maciel et al., 2002; Veiga Júnior et al., 2005; Cheng et al., 2007).

A espécie *P. microphyllus* Stapf ex Wardlew é nativa do Norte e Nordeste do Brasil, de ocorrência no leste do Estado do Pará, oeste e norte do Maranhão e no norte do Piauí, é conhecida popularmente como Jaborandi. Essa espécie movimenta o extrativismo com toneladas todos os anos nesses estados (Pinheiro, 1997). Das folhas desta espécie, são processados os sais cloridrato de pilocarpina, nitrato de pilocarpina,

além de sua forma livre (pilocarpina base) utilizados na formulação de colírios para tratamento do glaucoma (Tsai et al., 2003; Nordstrom et al., 2005).

Por estas razões, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* no sistema reprodutor de ratos machos.

Material e Métodos

Material Vegetal

O óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* foi fornecido pela empresa Phytobios, empresa brasileira voltada para o desenvolvimento e comercialização de tecnologias baseadas em Biodiversidade por meio de pesquisa, licenciamento, apoio regulatório e gestão de inovação. Esta empresa possui parceria com o laboratório de pesquisa Biotec da Universidade Federal do Piauí, campus Parnaíba. A utilização do óleo para este projeto foi cadastrado no SisGen com o nº AE07055.

Animais

Utilizou-se ratos Wistar adultos, provenientes do Biotério Central, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado, contendo maravalha, com água e ração ad libitum, em regime de luminosidade e temperatura controlada (ciclo de 12 horas claro/escuro, a $22 \pm 2^\circ\text{C}$). Todos os experimentos foram aprovados pela CEUA da Universidade Federal do Piauí sob o protocolo nº 289/17.

Delineamento Experimental

Utilizaram-se 28 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos (com aproximadamente 45 dias de idade), pesando entre 120g e 150g, divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=7). Três grupos receberam os tratamentos com OE-Pm (25, 50 e 100 mg/kg) e um grupo controle com solução de Tween 80 a 1% , via oral, uma vez ao dia, durante 60 dias. Após os tratamentos, os ratos foram eutanasiados de acordo com as normas do Conselho Federal de Medicina Veterinária (Resolução

37/CFMV, de 2018). Os órgãos (testículos, epidídimos, próstata, vesículas seminais, rins, baço, fígado e adrenais) foram removidos, retirados os ligamentos e pesados individualmente em balança analítica.

Concentração espermática

Coletou-se 0,1ml de fluido da cauda do epidídimo que foram transferidos para 1,9ml de solução fisiológica. Em seguida, as áreas superiores e inferiores da câmara de Neubauer foram preenchidas com essa amostra. Calculou-se o número de espermatozóides pela média dos valores encontrados nos quatro quadrantes laterais de cada área. Concentração de sptz/mL = Média obtida x 2 x 10⁶ (CBRA, 2013).

Análise de Motilidade e Vigor espermático

Para se avaliar a motilidade e vigor espermático, os espermatozoides da cauda do epidídimo foram colocados entre lâmina e lamínula previamente aquecidas e mantidas a 37°C durante a avaliação. A análise foi realizada sob microscopia de luz em aumento de 400X. A motilidade e o vigor espermático foram avaliados em uma escala de 0 a 5 (CBRA, 2013).

Análise histológica testicular

Para avaliar a morfologia das células testiculares, após eutanásia, os testículos de cada animal foram seccionados (com auxílio de tesoura) e colocados em álcool. Depois foram desidratados utilizando série crescente de álcool, diafanizados em xilol e, por fim, incluídas em parafina. Os blocos de parafinas foram cortados com 6µm de espessura e corados pelo método da hematoxilina-eosina para análise morfométrica.

Análise estatística

As variáveis foram avaliadas pelo teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a aderência à distribuição Normal. Foi usada a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Kruskal-Wallis para verificar se houve diferença entre os grupos controle e OE-Pm (25, 50 e 100 mg/kg). Em seguida foi utilizado o teste de Tukey para comparações múltiplas. Os dados foram tabulados e analisados no programa IBM Statistical Package for the Social Sciences versão 20. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Resultados

- **Análise do peso dos órgãos**

Como mostrado na tabela 1, o tratamento com óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* (OE-Pm) não interferiu no peso relativo dos testículos, epidídimo, vesículas seminais, rins, baço, fígado e adrenais, porém diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o peso da próstata de ratos tratados com OE-Pm na dose de 100mg/kg quando comparado com o grupo controle.

Tabela 1. Peso relativo dos órgãos (g) de ratos tratados por 60 dias com OE-Pm nas doses de 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg e não tratados.

	Grupo Controle	Grupo Óleo 25mg/kg	Grupo Óleo 50mg/kg	Grupo Óleo 100mg/kg	p-valor
Média dos testículos	1,69 ± 0,46	1,54 ± 0,05	1,35 ± 0,50	1,39 ± 0,10	0,077
Média epidídimos	0,65 ± 0,04	0,66 ± 0,04	0,79 ± 0,49	0,64 ± 0,19	0,749
Próstata	0,90 ± 0,15	0,85 ± 0,18	0,71 ± 0,19	0,64 ± 0,17*	0,038*
Vesículas seminais	1,68 ± 0,33	1,52 ± 0,20	1,66 ± 0,27	2,55 ± 3,77	0,202
Média rins	1,41 ± 0,08	1,27 ± 0,07	1,36 ± 0,14	1,26 ± 0,11	0,058
Baço	0,94 ± 0,16	0,96 ± 0,09	0,96 ± 0,15	0,95 ± 0,08	0,983
Fígado	12,5 ± 0,90	11,8 ± 0,79	12,0 ± 1,35	11,8 ± 1,59	0,305
Média adrenais	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,199

Os resultados expressam média ± erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado o grupo controle, pela ANOVA seguida do teste de Tukey.

- **Análise de motilidade e vigor espermático**

O tratamento crônico com tween 80 e OE-Pm nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg por 60 dias em ratos, não alterou as variáveis motilidade e vigor dos espermatozoides (tabela 2)

Tabela 2- Motilidade e vigor de espermatozoides de ratos tratados com tween 80 a 1% (controle) e OE-Pm nas doses de 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg.

	Grupo Controle	Grupo 25mg	Grupo 50mg	Grupo 100mg	p-valor
Motilidade	3,71 ± 1,11	4,00 ± 0,82	2,43 ± 1,27	3,43 ± 0,79	0,072
Vigor	3,29 ± 1,11	3,86 ± 0,90	2,29 ± 1,11	3,14 ± 0,90	0,087

Os resultados expressam média ± erro padrão pela ANOVA. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Tukey

- **Análise de concentração espermática**

Os resultados apresentados na figura 1 demonstram que o tratamento sub-crônico com o OE-Pm nas doses de 50 e 100 mg/kg em ratos, diminuiu a concentração de espermatozoides do epidídimo quando comparado com o grupo controle e grupo tratado com OE-Pm na dose de 25mg/kg.

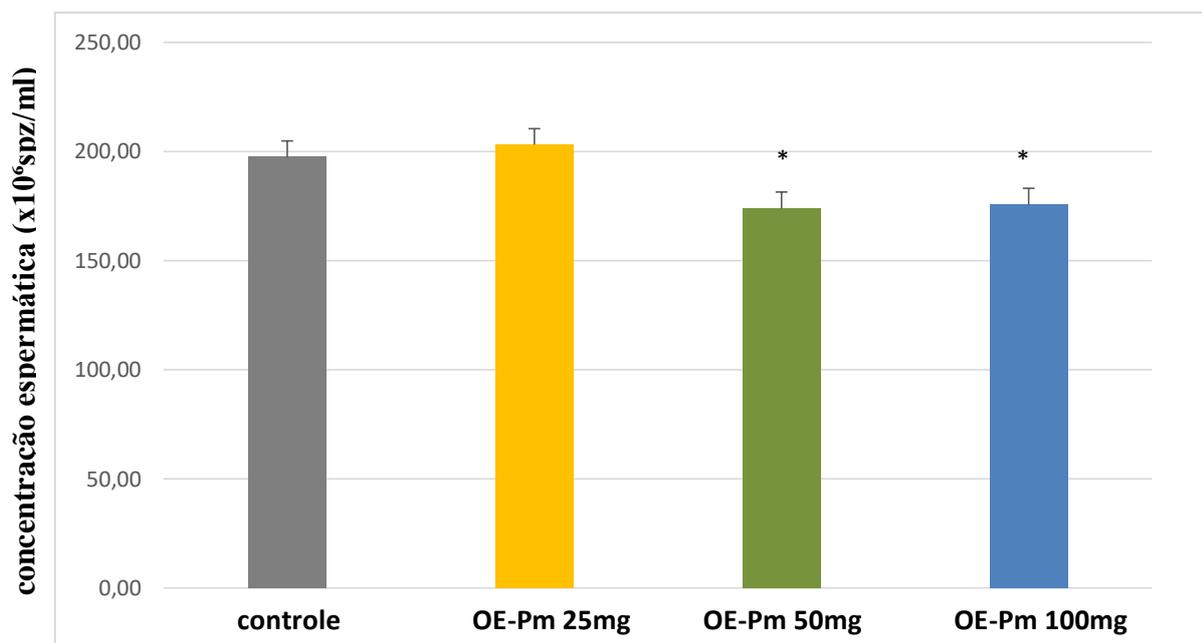


Figura 1. Efeito do tratamento de ratos com OE-Pm na concentração espermática (x10⁶spz/ml). Os resultados expressam média \pm erro padrão. *p<0,05 comparado o grupo controle e grupo tratado com OE-Pm 25 mg/kg. ANOVA seguida do teste de Tukey.

- **Análise histológica testicular**

Com relação à análise histológica dos testículos, verificou-se manutenção das características morfológicas gerais (figura 2). O padrão de organização do epitélio seminífero se apresentou sem alterações evidentes, em qualquer comparação.

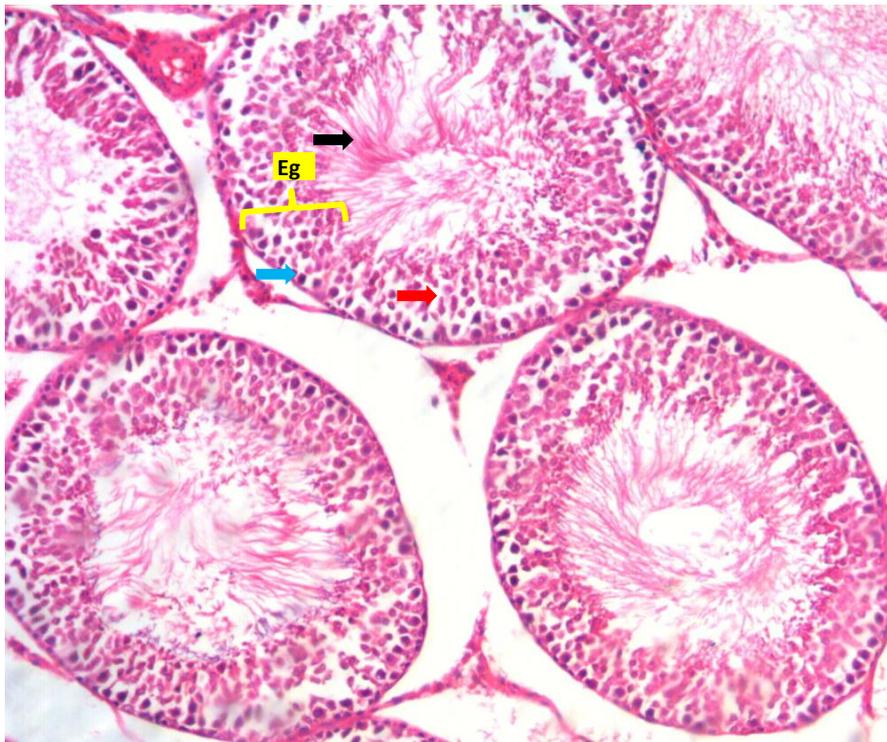


Figura 2. Fotomicrografia: túbulo seminífero. Eg – epitélio germinativo (células de Sertoli mais linhagens espermatogênicas); (seta azul) espermatogônias; (seta vermelha) espermatócitos; e (seta preta) flagelos das espermátides. Testículo de rato do grupo tratado com OE-Pm 25 mg/kg. HE. Aumento de 400x.

Discussão

Para avaliar a toxicidade reprodutiva, foram determinadas as massas dos testículos, dos epidídimos e da próstata. A avaliação do peso desses órgãos do sistema reprodutor masculino é um dos indicadores mais sensíveis para detecção da influência de substâncias (Mangelsdorf et al, 2003), pois o peso dos órgãos fornece informações para avaliações preliminares dos testes toxicológicos que podem indicar lesões nos sistemas dos quais fazem parte (Sellers et al, 2007).

Analisando os resultados, o peso dos testículos e epidídimo não foram alterados de forma significativa com relação aos tratamentos ($p < 0,05$). A importância da aferição do peso relativo dos órgãos sexuais e glândulas acessórias é que ela pode fornecer

indícios da função destes órgãos, bem como, da atuação da substância testada sobre o organismo (Ferreira et al, 2016).

Por outro lado, o peso da próstata diminuiu de forma significativa nos ratos tratados com OE-Pm na dose de 100mg/kg quando comparado com o grupo controle. A próstata é um órgão acessório que secreta o líquido prostático importante para aumentar a motilidade e a fertilidade dos espermatozoides (Ahlgren et al., 1995) e seu peso é andrógeno-dependente, podendo refletir mudanças no estado endócrino ou na função testicular do animal, onde níveis ideais de testosterona circulante são requeridos para manter a função testicular e de órgãos sexuais acessórios. Por isso, variações no peso testicular, prostático, da glândula vesicular e do epidídimo podem indicar alterações nos níveis desse hormônio (Chauhan et al, 2007; US EPA, 1996).

Esta alteração no peso da próstata pode indicar possível alteração nos níveis de testosterona circulante, pois trabalho realizado por Oliveira et al (2018, in press) mostrou alterações nas características sexuais (descida dos testículos e separação prepucial) de progênes de ratas tratadas com óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* que possivelmente tem como causa alterações hormonais androgênicas.

A avaliação do peso dos animais é utilizada como parâmetro para indicar o estado de saúde e desenvolvimento, bem como, pode fornecer informação importante sobre a toxicidade (HOLLENBACH et al.; 2015). Neste trabalho o peso relativo do fígado, rins, adrenais e vesículas seminais de ratos tratados com OE-Pm e Tween 80 a 1% não revelou diferenças entre os grupos estudados, sugerindo que o óleo e seu composto não causaram toxicidade sistêmica nos animais expostos, resultados estes que corroboram com Santos (2017) que utilizou óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. em tratamento com ratos, uma vez que o óleo dessa espécie possui monoterpeno em sua composição que assemelham com os encontrados na *Pilocarpus microphyllus*.

Motilidade, vigor, morfologia testicular e concentração espermática são importantes parâmetros para avaliação do potencial reprodutivo de machos, sendo a determinação da porcentagem de espermatozoides móveis, um dos testes mais utilizados para prever a qualidade seminal (Verstegen et al., 2002). De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, os espermatozoides do epidídimo de ratos tratados com OE-Pm e tween 80, não foram modificados significativamente com relação aos parâmetros motilidade e vigor. Uma redução nesses parâmetros teria consequências na capacidade de fertilização. Os espermatozoides saem dos testículos imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito e adquirem motilidade e capacidade fecundante após sua passagem pelo ducto epididimário (Shum et al., 2009). Já com relação à concentração espermática, os ratos tratados com OE-Pm nas doses de 50 e 100 mg/kg apresentaram redução da concentração espermática quando comparados com ratos tratados com Tween 80 e OE-Pm na dose de 25mg/kg. Essa redução na concentração espermática tem como consequência uma baixa na qualidade seminal e fertilidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Mazaro et al (2002) que avaliaram os efeitos do extrato hidrometanólico de *Austroplenckia populnea* e verificaram que apesar do peso da cauda dos epidídimos de ratos não diferirem entre os grupos controle e tratado, houve redução na concentração de espermatozoides estocados no órgão. A diminuição no peso da próstata e na concentração espermática, conseqüentemente houve uma diminuição na qualidade seminal desses animais tratados com OE-Pm.

Em conclusão, os resultados do presente estudo mostram uma possível interferência do OE-Pm na qualidade espermática em ratos, porém são necessários estudos mais aprofundados para verificar se essas interferências prejudicam na fertilidade dos ratos expostos a esse tratamento com OE-Pm.

Referências

Ahlgren, G.; Rannevik, G.; Lilia, H. 1995. Impaired secretory function of the prostate in men with oligo-asthenozoospermia. *Journal of Andrology*, v. 16, p. 491-498.

Dewick, P.M. 2002. *Medicamentos naturais: uma abordagem biossintética*. Wiley. New York.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte, 2013. 104 p.

Chauhan A , Agarwal M , Kushwaha S , Mutreja. 2007 Suppression of fertility in male albino rats following the administration of 50% ethanolic extract of *Aegle marmelos*. *Contraception*, v. 76, p. 474-481.

Cheng, J.T. Yeh, C.H.; Wang, H.E. 2007. Application of bioassay in the safety and/or quality control of herbal products. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 15, n. 4, p. 372-376.

Ferreira, MDS; Moura, ER; Batista, EKF; Silva, SMMS; Filho, FCC; Batista, MCS. Reproductive toxic potential of the evaluation of the *Buchenavia* sp fruit extract in prepurbetal Wistar rats. 2016. *Archives of Veterinary Science*. V21, n2, p.79-86

Guerra, M.O; Peters, V.M. 2015. Ausência de toxicidade reprodutiva e sistêmica em ratos Wistar tratados com extrato seco de *Gingko biloba* durante o período de desmame à puberdade. ***Interdisciplinary Journal of Experimental Studies***. v7, n1.

Glina, S; Nova, T; Brand, V.B.F; Molina, E; Galuppo, A.G; Correa, N.R; Moreira, F.R. 2010. Avaliação dos parâmetros seminais em doadores de sêmen no período de dez anos na cidade de São Paulo. **Einstein (São Paulo)**. vol.8 no.4.

Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Godinho RO, Nogueira TCML. 2007 .Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmam G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS.

Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga, V. F.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438..

Mangeisdorf, I; Buschmann, J; Orthen, B. 2003. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemical on male fertility. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. V.37. 356-369.

Mazaro, R, Di Stasi, L.C; Kepinas, W. G. 2002. Effects of the hidromethanolic extract of *Austroplenckia populnes* (Celastracea) on reproductive parameter of male rats. **Contraception**, 66:205-209.

Michalany, J. Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 1980.São Paulo, E.P.U., 1980. p.22-31.

Moundipa, F.P , Kamtchouing, P. , N Koueta , Tantchou, J , Foyang, N.P , Mbiapo,

F.T . 1999. Effects of aqueous extracts of *Hibiscus macranthus* and *Basella alba* in mature rat testis function. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 65, n. 2 p. 133-139

Nordstrom, B.L.; Friedman, D.S.; Mozaffari, E.; Quigley, H.A.; Walker, A.M. 2005. Persistence and adherence with topical glaucoma therapy. *American Journal of Ophthalmology*, v. 140, n. 4, p. 598-606.

Oliveira, M.S; Araujo, I.L.M; Costa, A.P.R. Avaliação da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) em ratos machos Wistar. 2018. Brazilian Academy of Sciences.

Pinheiro, C.U.B. 1997. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): uma espécie selvagem e sua rápida transformação em cultivar. *Economic Botany*. v. 51, n. 1, p.49-58.

Rodrigues, H. G., Meireles, C.G.; Lima, J.T.S.; Toledo, G.P.; Cardoso, J.L.; Gomes, S.L..2011. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, n.3, p. 359-366.

Raunig, J. M.; Yamauchil, Y.; Ward, M. A.; Collier, A. C 2011. Placental inflammation and oxidative stress in the mouse model of assisted reproduction. *Placenta*, v. 32, n. 11, p. 852- 858.

Sawaya, a. Costa, Y.; Mazzafera, P. 2015. Desvendando a biossíntese de pilocarpina em *Pilocarpus microphyllus*. *Nat Prod Commun*. V.10: 721-724.

Sellers, R.S , Morton, D , Michael ,B , Roome, N , Johnson, J.K , Yano, B.L , Perry,

R. , Schafer, K . 2007. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: OrganWeight Recommendations for Toxicology Studies. *Toxicologic Pathology*, v.35, p.751-755.

Shum, W.W, Da Silva, N., Brownd, D; Breton, S. 2009. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *J Exp Biol*; 212: 1753-61.

Tsai, J.C.; McClure, C.A.; Ramos, S.E.; Schlundt, D.G.; Pichert, J.W. 2003. Compliance barriers in glaucoma: a systematic classification. *Journal of Glaucoma*, v. 12, n. 5, p. 393-398

US EPA – Environmental Protection Agency. Guidelines for reproductibe toxicity risk assessment. 1996. Washington.. EPA/630/R-96/009.

Mazaro, R., Di Stasi, L.C, Kempinas W.G. 2002. Effects of the hydromethanolic extract of *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) on reproductive parameters of male rats. *Contraception*, 66: 205-209.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1998. . EPA/600/R-98/087: Research Plan for Endocrine Disruptors. Washington: USEPA.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). EPA/630/R-96/012: 1997. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Washington: USEPA.

Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; MAciel, M. A. M. 2005. Plantas medicinais: cura

segura? Química Nova, v. 28, n. 3, p. 519-528.

Verstegen, J, Iguer-Ouada, M, Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179.

Yu, Z-Z; Chen, J.; Shou, P-Q.; Feng, L. 2014. Effects of micronutrients on the reproduction of infertility rat model induced by adenine. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 9, p. 2754-2762.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu identificar os possíveis efeitos do óleo essencial de Jaborandi nos diferentes aspectos reprodutivos de ratos, contribuindo para a obtenção de informações importantes como o consumo consciente do óleo pela população. Apesar dos efeitos do óleo nas progênes não serem considerados como alterações de má-formação não se sabe ao certo na vida adulta do animal as consequências do uso, porém mostrou ter possível ação endócrina, como fitoestrogênica.

Nos ratos adultos machos, a diminuição do peso da próstata sem alteração de motilidade e vigor, mostra uma possível ação terapêutica, uma vez que vários casos de hiperplasia prostática ainda é algo recorrente na clínica e com tratamento limitado, porém como houve alteração na concentração espermática, o uso deve ser com cautela e necessário investigações mais aprofundada.

REFERENCIAS

ACUFF-SMITH KD, SCHILLING MA, FISHER JE, VORHEES CV. Efeitos específicos de um estágio de exposição-d metanfetamina pré-natal no desenvolvimento comportamental e de olho em ratos. **Neurotoxicol Teratol.** 18 . :199-215, 1996

ALBUQUERQUE, U.P; MONTEIRO, J.M; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C; ALVES, R.R.N. Ethnobiological Research in Public Markets. **Journal of ethnopharmacology** V110, P 76-91, 2014.

ANDRADE, S. F.; FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. ; ANDRADE NETO, J. P.; KANASHIRO, G. P. Terapêutica do sistema nervoso. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 3. ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 492-513.

ANTUNES-RODRIGUEZ, J.; FAVARETTO, A.L.V. Sistema reprodutor. Fisiologia. 2ªed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1999.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia Para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos. RESOLUÇÃO - RE Nº 90, DE 16 DE MARÇO DE 2004.

ARRUDA, J.T. et al. Efeito do extrato aquoso de camomila (*Chamomilla recutita* L.) na prenhez de ratas e no desenvolvimento dos filhotes. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.66-71, 2013.

BADKE, M.R; RESSEL, L.B.; BUDÓ, M.L.D; SILVA, F.M. plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popularesc. **Anna Nery (impr.)** jan-mar; 15 (1):132-139, 2011.

BENTO RRF, LE SILVA, FARIA JLB, PTC FREIRE, MCF DE OLIVEIRA, ROMERO NR. Espectros vibracionais comparativos de cristais de pilosina e epiisopilosina. **Braz J Phys.** 40: 217-223. 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. Disponível em:< <http://portal.saúde.gov.br> > Acesso em: 19 jul. 2009

BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 781-788, 2014.

BUFALO, A.C. **Antidepressivo hypericum perforatuml. sobre o sistema reprodutivo masculino de ratos wistar**. 2007. Dissertação (Mestrado). UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Curitiba- PR.

BURNETT AL. Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. **Int J Impot Res.**; 16: S15-9.2004.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis*. Desf., *Copaifera duckei*. Dwyer and *Copaifera multijuga*. Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 773-778, 2000.

CASTRO MLS, CUNHA CJ, MOREIRA PB. Frequência das Malformações Múltiplas em Recém-Nascido na Cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, e Fatores Sócio-Demográficos **Associados. Cad Saúde Pública**; 22(5): 1009-15.2006.

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Manual para técnicos em bioterismo. 2a. Ed. São Paulo: H.A. Rothschild. 259p.1996.

CORRÊA, M.P. 1969. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**, Vol. 4, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro. pp. 360-369.

DEAN RC, LUE TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **Urol Clin N Am**, 32(4):379-395, 2005.

DIAZ, R.; GARCIA, L.; SILVA, J.L.M; SILVA, S.R; PÉREZ, C.A.; ARANDA-ABREU, G.E; MANZO, J.; TOLEDO, R.; HERNANDEZ, E.M.. Histological modifications of the rat prostate following transaction fo somatic and autonomic nerves. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. V.82, n2.p.397-404, 2010.

FAVERO, A.M. **efeitos da exposição materna ou paterna ao disseleneto de difenila sobre o desenvolvimento intra-uterino da prole de ratas wistar**. 2006.Dissertação (Mestrado). UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica. Santa Maria – RS.

FRANÇA, L.R. CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H.F./; COLLARES-BUZATO, C.B. Células uma abordagem multidisciplinar. **Editora Manole**, Barueri- SP. Cap. 24, p.302-324. 2005.

GEHLEN, K.A. **Avaliação toxicológica dos benzodiazepínicos diazepam e maleato de midazolam sobre o desenvolvimento pré-natal de ratos Wistar**. 2003. 78f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GIL-MONTOYA, J. A; SILVESTRE FJ , BARRIOS R , SILVESTRE-RANGIL J .. Treatment of xerostomia and hyposalivation in the elderly: A systematic review. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**. março 2016.

GÓRNIAC, S.L.; SPINOSA, H.S.; BERNARDI, M.M. Toxicologia do desenvolvimento. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; PALERMO-NETO, J. In: Toxicologia aplicada à medicina veterinária. São Paulo: **Manole**, 2008. Capítulo 25. 942p

GRANCE, S.R.M. **Efeito do extrato hidroetanólico de Baccharis trimera em ratas prenhes e seus conceptos**. 2007. 79f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

GRAHAM, M. T.; NADEAU, K. C. Lessons learned from mice and man: Mimicking human allergy through mouse models. **Clinical Immunology**, v. 155, n. 1, p. 1–16, 2014

GUERRA, M.O. Reprodução Feminina, fisiologia de hipotálamo, hipófise e ovário. 1.ed. **Editor**, Juiz de fora, 2006.

GUIMARÃES MA, CAMPELO YDM, VÉRAS LMC, LIMA, DF, CIANCAGLINI P, KUCKELHAUS SS. Abordagem nanofarmacêutica do alcalóide epiisopiloturino transportado em sistema de lipossoma: preparação e atividade esquistossomicida *in vitro* . **J Nanosci Nanotechnol**. 2014.

HOROVITZ DDG, LLERENA JUNIOR JC, MATTOS RA. Atenção aos Defeitos Congênitos no Brasil: Panorama Atual. **Cad Saúde Pública**; 21(4): 1055-64, 2005.

HSU GL, BROCK G, MARTINEZ-PINEIRO L,: Anatomy and strength of the tunica albuginea: Its relevance to penile prosthesis extrusion. **J Urol**; 151:1205-1208.1994.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**, v. 28, 2013.

JOSEPH, C. J. Revisão sistemática do gênero *Pilocarpus* (sp. brasileiras). *Mecânica Popular*, v. 40, p. 1-9. 1967.

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, p. 19 – 39, 2001.

LEONG, A. S. Y.; MATTHEWS, C. D. The role of testicular biopsy in the investigation of male infertility. **Pathology**, v.14, p.205-10, 1982.

LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M; BARREIRO, E.J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 5, 683-688, 2001.

LIMA, D.F.; DE LIMA, L.I.; ROCHA, J.A.; DE ANDRADE, I.M.; GRAZINA, L.G.; VILLA, C. et al. Variação sazonal nos principais alcalóides de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), uma espécie economicamente importante da flora brasileira. **PLoS ONE** 12 (2): e0170281. 2017.

LOPATE, C.; THRELFALL, W. R.; ROSOL, T. I. Histopatologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. **Theriogenology**, v.32, p.585-602, 1989.

MACHADO, B. F. M. T.; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Caderno acadêmico**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011

MARQUES, M. E. T.; COSTA, J. P. C. Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*). Belém: EMBRAPA-CPATU, 4. 1994

MELLO J.R.B; LANGELOH A. Avaliação da toxicidade reprodutiva e teratogenicidade, In: RHODEN E. L.; RHODEN C.R, **Princípios e Técnicas em Experimentação Animal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, pp 455 – 464, 2006.

MELLO, F.B.; LANGELOH, A.; MELLO, J.R.B. Toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Passiflora alata*, *Erythrina mulungu*, *Leptolobium elegans* e *Adonis vernalis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires , v. 26, n. 2, p. 191–200, 2007.

MELLO, M. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos**. 2007, 131f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária). Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2007

MENGUE, S.S.; MENIZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V11;.2001.

MONTANARI, T. O uso popular de plantas como emenagogas e abortivas / The use of plants as emmenagogue and abortifacient agents. **Reprodução & Climatério**, v. 23 n. 4, p. 170-175, 2008.

MONTELOS, R.; PINHEIRO, C. U. B.; Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. Vol. 7. Nº 2. 2007.

MULLER, J.C., GIULIANA G.K; BOTELHO, A. C; BUFALO, A. C; BOARETO; *Morinda citrifolia* Linn (Noni): toxicologia reprodutiva in vivo e in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**. 121 (2): 229-233 2008

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requeriments of dairy cattle. 6.rev.ed. **Washinton**, D.C. 157p, 1989

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I. Possible consequences of pre – or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. **Endocrinology Chemistry Environmental**, v. 3, p. 24 – 52, 1995.

O'DONELL, B., COLOMBO, E. M. Simple reaction times to chromatic stimuli: Luminance and chromatic contrast. **Journal of Lighting Research and Technology**, 40(4), 359-371.2008.

PAGLIARANI, S.; LUCCHIARI, S.; ULZI, G.; et al. Glycogen storage disease type III: A novel Agl knockout mouse model. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 11, p. 2318–2328, 2014.

PINHEIRO, A. L. Produção de óleos Essenciais, **Viçosa**: CPT, 2003.

PINHEIRO, C. U. B. Extrativismo, cultivo e privatização do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 2, p. 141-150, 2002.

PINHEIRO, C.U.B.. Jaborandi (*Pilocarpus* spp., Rutaceae): A Wild Species and Its Rapid Transformation into a Crop. **Journal for Economic Botany**. **51** (1), 49 – 58. 1997

QUINLAN DM , NELSON RJ , PARTIN AW , MOSTWIN JL , WALSH PC .. The rat as a model for the study of penile erection. **J Urol.**, v. 141, p. 656-61,1989.

RAUNIG, J. M.; YAMAUCHI, Y.; WARD, M. A.; COLLIER, A. C. Placental inflammation and oxidative stress in the mouse model of assisted reproduction. *Placenta*, v. 32, n. 11, p. 852- 858, 2011.

RASKIN,I.;RIBNICKI,D.M.;KOMAMYTSKY,S.;ILIC,N.;POLEV,A.;BORISJUK,N.P lantast health in the twenty-first century. **Trends in Biotech.**, [S.I], v.20.n 12, p.522-531,dezembro, 2002.

RATTMANN, Y.D; MARTINS,E.S; CABRINI,D.A; OTUKI, M.F; DALSENTER,P.R **Toxicidade reprodutiva da *Morinda citrifolia* Linn.** Journal of Ethnopharmacology 12, p. 229–233, 2009.

REHMAN J, MELMAN A. Normal anatomy and physiology. In: Mulcahy JJ, editor. Male sexual function – a guide to clinical management. **Totowa: Human Press**; p. 1-46. 2001.

RISBRIDGER, G.P.; TAYLOR, R.A. physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In: NEILL, J.D. et al. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. **San Diego. Elsevier**,.p.1149-1172. 2006.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. N. Uso popular de plantas medicinais. **Saúde & Ambiente em Revista**, v.1, n.2, p.76-85, 2006

ROCHA JA, ANDRADE IM, VÉRAS LMC, QUELEMES PV, LIMA DF, SOARES MJS. Atividade anti-helmíntica, antibacteriana e citotoxicidade de alcalóides imidazólicos de folhas de *Pilocarpus microphyllus* . **Phytother Res.**; 31: 624-630. 2017

RODRIGUES, H G et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai, Botucatu**, v. 13, n. 3, p.359-366, jan. 2011.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n. 2, p. 115 – 137. 2004.

SANTOS, T.R. **Desenvolvimento neonatal de crias de ratas Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) tratadas com Flavanóide Ipriflavona durante a lactação plena.** 2011. 52f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

SKORUPA, L. A. Espécies de *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) da Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, v. 30, n. 1, p. 59-70, 2000

SATTAR AA, WESPES E, SCHULMAN CC. Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. **Eur Urol.** (2):142-4. 1994.

SAWAYA, A.C.H.F. ABREU, I.N., ANDREAZZA, N. L., EBERLIN, M.N., MAZZAFERA., HPLC-ESI-MS/MS of imidazole alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. **Molecules** 2008.

SILVA, J.C. **Identificação de compostos de avaliação citotóxica, antibacteriana, antioxidante e antifúngico do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus*.** 2017. Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí. Parnaíba-PI

SCHÜLER-FACCINI, L; SANSEVERINO, M.T.V.; PERES, R.M.. Avaliação de teratógenos na população brasileira. **Ciência & Saúde Coletiva**, 7(1):65-71,2002

SHEPARD, T. H. Agents That Cause Birth Defects, Younsei. **Medical Journal**, vol 36, nº 5,393-395, 1995.

SILVA, R. B. L. A **Etnobotânica de plantas medicinais da comunidade quilombola de Curiaú, MacapáAP.** 172f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural da Amazônia. Manaus, AM. 2002

SIMÕES, C.M.O, SCHENKEL, E.P, GOSMANN, G, MELLO, J.C.P, MENTZ, L.A, PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC; 2001

TAVEIRA, F. S. N., ANDRADE E. H. A., LIMA W. N., Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75: 27 - 31, 2003.

UDO, M.S.B. **Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição pré-natal ao fipronil na prole de ratas Wistar.** 2012. 146f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo, São Paulo

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VÉRAS, L. M. C. et al. Activity of Epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. *Current. Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 2051-2058. 2012.

VITAL, M. A. B. F.; ACCO, A. Agonistas e antagonistas colinérgicos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan.**, p.67-79, 2006.

VIVINO, F. B.; AL-HASHIMI, I.; KHAN, Z.; LEVEQUE, F. G.; SALISBURY, P. L.; TRAN-JOHNSON, T. K.; MUSCOPLAT, C. C.; TRIVEDI, M.; GOLDLUST, B.; GALLAGHER, S. C. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye

symptoms in patients with Sjögren syndrome. **Archives of internal medicine**, v. 159, n. 2, p. 174-181. 1999.

YU, Z-Z; CHEN, J.; SHOU, P-Q.; FENG, L. Effects of micronutrients on the reproduction of infertility rat model induced by adenine. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 9, p. 2754-2762, 2014.