



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

JAMILLY ÉRICA SOUSA CAMPÊLO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA E SISTÊMICA DO ÁCIDO  
ELÁGICO EM RATOS WISTAR**

**TERESINA- PI**

**2018**

**JAMILLY ÉRICA SOUSA CAMPÊLO**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA E SISTÊMICA DO ÁCIDO  
ELÁGICO EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre 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

**C193a** Campêlo, Jamilly Érica Sousa

Avaliação da toxicidade reprodutiva e sistêmica do ácido elágico em ratos wistar / Jamilly Érica Sousa Campêlo - 2018.

84 f. : il.

Dissertação ( Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

1. Medicina veterinária – Órgãos urogenitais 2. Medicina veterinária - Espermatogênese 3. Ácido elágico (A E) - Ratos wistar 4. Ovário 5. Útero 6. Fitoquímico 7. Tanino I. Título

**CDD 636.089 16**

## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA E SISTÊMICA DO ÁCIDO ELÁGICO EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que realizada de acordo com as normas da ética científica.

Orientador: Amilton Paulo Raposo Costa

**Dissertação aprovada em: 18/04/2018**


**Banca Examinadora:**



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



**Profa. Dra. Janylla Mirck Guerra de Oliveira (Interna) / CPCE/UFPI**



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

Aos meus pais **Maria das Dores de Sousa Campelo e José Adaide Campelo da Silva (in memoriam)**, aos meus irmãos **Jardson e Jakelinne** e aos meus sobrinhos **Alcides, Sophia e Ana Alice.**  
**AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela força e coragem diária para concluir essa etapa, sem Ti nada seria.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, vocês foram essenciais nessa caminhada, amo vocês imensamente.

Ao professor Amilton, meu orientador, pelo incentivo à pesquisa e por toda dedicação aos seus orientandos, que venha o doutorado.

Ao meu colaborador Gabriel Sandro e aos colegas de laboratório, em especial Daniela Kunkel por toda ajuda durante essa minha caminhada e Emanuela Ribeiro pelas conversas e risadas.

A Emanuela Frota pela dedicação e amizade, você foi muito importante nessa minha trajetória.

Aos amigos Tiago, Lisiane e Júnior que nunca me deixaram desanimar, que bom poder contar sempre com vocês.

A médica veterinária, Silvéria Regina, que foi como uma mãe para mim, sempre calma e paciente em poder me ajudar, tenho um carinho enorme por você.

Aos animais que foram extremamente importantes para o desenvolvimento do meu projeto que com as suas vidas tornaram esta pesquisa uma realidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos.

Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.

Albert Einstein

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
1 INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1 TOXICIDADE DOS TANINOS .....	19
2.2 ESTUDO DA TOXICIDADE SISTÊMICA .....	21
2.3 ESTUDO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA NAS FÊMEAS .....	23
2.4 ESTUDO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA NOS MACHOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 ESTRUTURAÇÃO DA DISSERTAÇÃO .....	33
CAPITULO I - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR E OUTROS SISTEMAS ORGÂNICOS DE RATOS WISTAR .....	32
RESUMO .....	33
INTRODUÇÃO .....	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
RESULTADOS.....	39
DISCUSSÃO .....	44
RESUMO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	53
RESULTADOS.....	55
Toxicidade sistêmica.....	55
REFERÊNCIAS.....	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS .....	69
ANEXO I - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	81
ANEXO II – Certificado de Análises do Ácido Elágico .....	82





## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1-</b> Estrutura química do ácido elágico-----	16
<b>Figura 2 -</b> Ciclo estral de ratas e suas variações hormonais -----	24
<b>Figura 3 -</b> Esfregaço vaginal apresentando leucócitos (a), células arredondadas nucleadas(b) e células epiteliais cornificadas (c)-----	25
<b>Figura 4 -</b> Períodos de desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato -----	27
<b>Figura 5 -</b> Sistema urogenital de rato-----	28
<b>Figura 6 –</b> Espermatogênese no rato-----	30

### CAPITULO I

<b>Figura 1:</b> Morfologia espermática dos animais tratados com água destilada(controle) e nas doses de 3,10 e 30 mg/kg do ácido elágico. a) - controle, b) - 3mg/kg de ácido elágico, c) - 10mg/kg de ácido elágico e d) - 30 mg/kg de ácido elágico-----	43
<b>Figura 2:</b> Imagem de cortes histológicos dos testículos dos animais tratados com água destilada (controle) e ácido elágico nas doses de 3,10 e 30 mg/kg. a) - controle, b) - 3mg/kg de ácido elágico, c) - 10mg/kg de ácido elágico e d) - 30 mg/kg de ácido elágico-----	44

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

**Tabela 1:** Massa corpórea, consumo de água e ração e ganho de peso dos ratos após 28 dias de administrações do ácido elágico nas diferentes doses-----

40

**Tabela 2:** Efeito da administração oral do ácido elágico sobre o peso relativo (g) [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] de ratos tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do Ácido Elágico (3, 10 e 30 mg/kg) ao final de 28 dias-----41

**Tabela 3:** Índice de fecundação (%) de ratos tratados com água destilada (controle) e diferentes doses do Ácido Elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante o período de acasalamento-----42

**Tabela 4:** Avaliação espermática de ratos tratados com água destilada (controle) e diferentes doses do Ácido Elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante o período de tratamento (28 dias)-----43

### CAPITULO II

**Tabela 1 -** Avaliação da duração das fases do ciclo estral de ratas Wistar tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do ácido elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante 14 dias -----59

**Tabela 2 -** Avaliação da toxicidade gestacional através da avaliação de fecundidade e do número de implantações das ratas tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do ácido elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante 14 dias de acasalamento-

-----	60
<b>Tabela 3</b> - Avaliação dos filhotes das ratas tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do ácido elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante a gestação e por 13 dias	
de lactação-----	61
<b>Tabela 4</b> - Efeito da administração oral do ácido elágico sobre a massa relativa (g) [(massa do órgão em relação a massa corporal) X100] dos órgãos de ratas tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do ácido elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante 63 dias-----	62
<b>Tabela 5</b> - Consumo de ração e água, evolução ponderal e ganho de peso corporal de ratas tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do ácido elágico (3,10,30mg/kg) durante 63 dias-----	63

CAMPELO, J.É.S. **Avaliação da toxicidade reprodutiva e sistêmica do ácido elágico em ratos Wistar**. Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018. 83 p.

## RESUMO

Ácido elágico (AE) alvo deste estudo, vem sendo nos últimos anos bastante estudado devido as suas mais diversas propriedades e benefícios a saúde humana. É um fitoquímico derivados de frutas, umas das suas principais fontes são a romã, o morango e alguns frutos secos, como as nozes. É considerado um excelente antioxidante, tem efeito anti-inflamatório, antineoplásico e quimiopreventivo. O objetivo deste estudo foi investigar os possíveis efeitos da administração oral do ácido elágico (AE) sobre os parâmetros reprodutivos e sistêmicos de ratos Wistar, machos e fêmeas visando o conhecer sua toxicidade, de forma a indicar o grau de segurança como agente terapêutico. Para os protocolos experimentais de toxicidade nos machos foram utilizados 40 ratos Wistar e 40 ratas Wistar para acasalamento, os machos foram divididos em 4 grupos de acordo com as doses do AE: grupo controle (água destilada) / (GC) e os grupos tratamento de 3,10 e 30 mg/kg do AE, nos quais se realizaram os seguintes testes: consumo de água e ração, massa corpórea, alterações comportamentais, coleta dos órgãos e pesagem e avaliação da fertilidade. Para os protocolos experimentais nas fêmeas foram utilizadas 32 ratas Wistar e 16 ratos Wistar para acasalamento, as fêmeas foram divididas em 4 grupos de acordo com as doses do AE: grupo controle (água destilada) / (GC) e os grupo tratamentos de 3,10 e 30 mg/kg do AE, nos quais se realizaram os seguintes testes: avaliação do ciclo estral, toxicidade gestacional, avaliação da ninhada, consumo de água e ração, massa corpórea, alterações comportamentais, coleta dos órgãos e pesagem. Os dados foram avaliados por análise de variância seguida pelo teste Student Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). Os resultados para o protocolo nos machos demonstraram que o AE não alterou o ganho de peso dos animais tratados. Houve uma diminuição na massa relativa dos órgãos, baço e rins no grupo de 30 mg/kg quando comparado ao GC, porém os animais não apresentaram sinais comportamentais de toxicidade. Não houve diferença significativa na morfologia espermática. A concentração espermática teve redução significativa nos grupos de 10 e 30 mg/ kg quando comparado ao GC. A análise histopatológica dos órgãos reprodutivos não apresentou alterações quando

comparado ao GC. Para o protocolo nas fêmeas, os resultados demonstraram que o AE reduziu o consumo de ração e água na dose de 10 mg/kg, porém não alterou o ganho de peso nem a massa relativa dos órgãos dos animais tratados quando comparado ao GC. Além disso, não provocou alterações histopatológicas dos órgãos reprodutores, sinais comportamentais de toxicidade, nem alteração do ciclo estral ou toxicidade gestacional. Observou-se apenas um aumento significativo no ganho de peso dos filhotes, no grupo de 3 mg/kg no dia 4. Conclui-se que o ácido elágico não apresenta toxicidade reprodutiva ou sistêmica relevantes nas fêmeas, dentro do intervalo de doses e no período de tempo utilizado. No macho, produz pequena redução na concentração espermática, sem prejudicar a capacidade de fecundação.

Palavras-chaves: espermatogênese; fertilidade; ovário; útero; fitoquímico; tanino.

CAMPELO, J.É.S. **Evaluation of the reproductive and systemic toxicity of ellagic acid in Wistar rats.** Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 201 8.83 p.

### ABSTRACT

Elágico acid (AE) object of this study, has been studied in recent years due to its different properties and benefits to human health. It is a phytochemical derived from fruits and its main sources are pomegranate, strawberry and some nuts such as walnuts. It is considered an excellent antioxidant and has anti-inflammatory, antineoplastic and chemopreventive effect. The objective of this study was to investigate the possible effects of oral administration of ellagic acid (AE) on the reproductive and systemic parameters of male and female Wistar rats in order to know their toxicity, in order to indicate the degree of safety as a therapeutic agent. For the experimental protocols of toxicity in males 40 males and 40 females Wistar were used for mating. The males were divided into 4 groups according to the AE doses: control (distilled water) / (CG) and treatment groups of 3,10 and 30 mg / kg EA, in which the following tests were performed: consumption of water and feed, body mass, behavioral changes, organ collection and weighing and fertility evaluation. For the experimental protocols in the females were used 32 females and 16 males Wistar for mating. Females were divided into 4 groups according to the AE: control group (distilled water) / (GC) and the 3,10 and 30 mg / kg EA treatments, in which the following tests were performed: evaluation estrous cycle, gestational toxicity, litter evaluation, water and feed intake, body mass, behavioral changes, collection and weighing of organs. Data were analyzed by analysis of variance followed by the Student Newman-Keuls test ( $p < 0.05$ ). The results of the protocols with males showed that EA did not alter the weight gain of treated animals. There was a decrease in the relative mass of the spleen and kidneys in the 30 mg / kg group when compared to CG, but the animals showed no behavioral signs of toxicity. There was no significant difference in sperm morphology. The sperm concentration had a significant reduction in the 10 and 30 mg / kg groups when compared to the CG. The histopathological analysis of the reproductive organs showed no alterations when compared to the CG. For the protocol in the females, the results showed that the AE reduced the feed and water consumption at the dose of 10 mg / kg, but did not alter the weight gain nor the relative mass of the organs of the

treated animals when compared to the GC. In addition, it did not cause histopathological changes of the reproductive organs, behavioral signs of toxicity, nor alteration of the estrous cycle or gestational toxicity. There was only a significant increase in pup weight gain in the 3 mg / kg group on day 4. It was concluded that ellagic acid did not present any relevant reproductive or systemic toxicity in females, within the dose range and in the period of time used. In the male, it produces reduction in sperm concentration, without impairing the fertilization capacity.

Keywords: spermatogenesis; fertility; ovary; uterus; phytochemical; tannin.

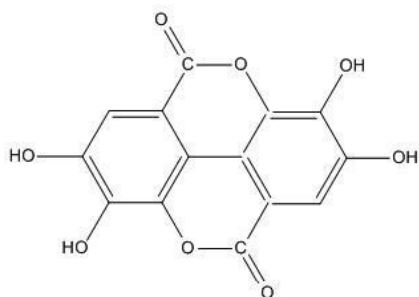


## 1 INTRODUÇÃO

Segundo Kang et al. (2016), o ácido elágico (AE) foi descoberto em 1831 por Braconnot e possui várias propriedades farmacológicas, tais como anticancerígenos, antioxidantes e propriedades quimiopreventivas. Por ser um dos precursores dos taninos hidrolisáveis, pode comumente ser encontrado em morangos, romãs, uvas muscadine, castanhas, amoras silvestres, framboesas (GONÇALVES, 2012) e em plantas medicinais como *Lafoensia pacari*, *Punica granatum* L., *Duschesnea chrysantha*, *Ficus glomerata* Roxb, *Juglans regia* L e *Pimenta dioica* (L.) Merr., apresentando-se na forma de elagitaninos, como componente estrutural da membrana e parede celular vegetal (BESERRA et al., 2010).

Os taninos hidrolisáveis podem sofrer hidrólise ácida ou microbiana para açúcar e compostos fenólicos simples que podem ser absorvidos e causam toxicidade, enquanto os taninos condensados são polímeros grandes com ligações carbonocarbono conectando unidades de flavonoides que são mais difíceis de degradar no intestino e, portanto, não são prontamente absorvidas, sendo menos tóxicos (MONTEIRO et al., 2005). Produtos tóxicos do final da degradação de tanino hidrolisável podem resultar em gastroenterite hemorrágica, necrose hepática e necrose tubular renal, enquanto os taninos condensados normalmente exercem seus efeitos negativos pela ligação e precipitação de proteínas e amido (ROGOSIC et al., 2008).

Estruturalmente, o ácido elágico corresponde a uma dilactona de ácido gálico, representado pela fórmula C<sub>14</sub>-H<sub>6</sub>-O<sub>8</sub> e pode ser encontrado na forma de elagitaninos e glicosilada. Altamente termooestável (ponto de fusão 359°C) o AE possui duas lactonas que podem atuar como doadores de elétrons conferindo, assim uma característica hidrofílica. Com peso molecular de 338,2 g/mol, ligeiramente solúvel em água, álcool e éter (CARDOSO, 2013). Estruturalmente, apresenta quatro anéis que representam o domínio lipofílico, quatro grupos fenólicos e duas lactonas, que formam os lados do hidrogênio e atuam como receptores de elétrons, respectivamente, e que representam o domínio hidrofílico (figura 1), possui ainda elevada capacidade antioxidante, com aplicações em diferentes áreas da indústria alimentícia, despertando interesse comercial nos últimos anos devido às suas propriedades, aplicações e benefícios para a saúde humana (SEPÚLVEDA et al., 2011).



**Figura 1-** Estrutura química do ácido elágico.

Fonte: ASCACIO-VALDÉS, et al., 2013

Esse ácido potencializa os níveis de glutathione, antioxidante produzido pelo organismo e que protege as células da ação dos raios solares, que induzem a formação de radicais livres. Além disso, inibe a proliferação de melanócitos, prevenindo manchas de sol. Estudos *in vitro* com a substância pura aplicada em membranas de células e no DNA mostraram que moléculas de AE se ligam ao cobre e ao ferro e impedem que eles formem radicais livres, atuam também como um “escudo” protegendo as moléculas, mesmo que os radicais livres sejam formados em pequena quantidade (SANDMANN, 2013).

Apesar de ser utilizado como suplemento alimentar no Japão, por suas propriedades antioxidantes, a avaliação da segurança desta substância só recentemente foi investigada em ratos, por adição à dieta basal em pó, com as doses até 39,1 g / kg nos machos e 42,3 g / kg em fêmeas misturados à ração (TASAKI et al., 2008). Estudos relataram efeitos coagulantes, bem como congestão dos linfonodos e baço após administração intravenosa de AE (30 mg/kg) em ratos (CHEN; CHUNG, 2000). Outros estudos sugeriram que AE exibe efeitos neuroprotetores contra danos oxidativos e efeitos antiproliferativos em ratos diabéticos, mas os mecanismos de sua ação nos níveis celular e molecular ainda não estão claros (MASHHADIZADEH, et al., 2017).

A biodisponibilidade de elagitaninos e AE é baixa em modelos humanos e animais devido à sua natureza hidrofóbica. A hidrólise de elagitaninos libera AE em condições fisiológicas, que é moderadamente absorvida e metabolizada pela microbiota intestinal para urolitina através da remoção de um dos dois grupos de lactona e posterior descarboxilação e reações de desidroxilação (SHENG WU; LI

TIAN, 2017). A identificação das urolitinas liberadas a partir de elagitaninos alimentares por microbiota intestinal é uma tendência atual na investigação fenólica devido à implicação desses metabólitos microbianos como potenciais compostos antiinflamatórios, antioxidantes, cardioprotetores, neuroprotetores e preventivos do câncer (ESPÍN, et al.,2013).

Estudo realizado verificou que o AE pode ser detectado, a uma concentração máxima de 0,06  $\mu\text{M}$ , na circulação sanguínea de voluntários saudáveis dentro de meia hora após ingerir suco ou extratos de romã. Foi também demonstrado que as concentrações de urolitina atingiram até 18,6  $\mu\text{M}$  no plasma de voluntários saudáveis depois de consumir suco de romã por cinco dias consecutivos (SHENG WU e LI TIAN, 2017).

Devido à ampla distribuição do AE em algumas frutas e plantas medicinais e a falta de pesquisas que testem seus efeitos sobre o sistema reprodutor, consideram-se relevantes os estudos nesta área, uma vez que estes podem contribuir para o uso seguro do ácido elágico derivado de tais vegetais. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do ácido elágico sobre o sistema reprodutor e outros sistemas orgânicos de ratos Wistar.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 TOXICIDADE DOS TANINOS**

Taninos são compostos fenólicos presentes em plantas, alimentos e bebidas que podem ser tóxicos dependendo do peso molecular. De acordo com a sua estrutura são classificados em hidrolisáveis e condensados. Apresentam baixa solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides (TAHMOURESPOUR et al., 2016). Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glicoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (RINALDO, 2010).

São substâncias comerciais importantes, tradicionalmente utilizadas para preparação de couro, outros usos incluem adesivos, como substituintes de fenol nas

formulações, aplicações médicas, cosméticas, farmacêuticas e indústrias alimentares. A extração de taninos de resíduos vegetais constitui uma importante contribuição para sua reutilização e valorização e para a produção sustentável de taninos (AIRES et al., 2016).

Quimicamente, os taninos são moléculas fenólicas relativamente volumosas, resultantes da polimerização de moléculas elementares de função fenol. Sua configuração espacial está relacionada com sua reatividade. Segundo a natureza das moléculas elementares, diferenciam-se em taninos hidrolisáveis ou gálicos e taninos condensados ou catéquicos. Os taninos hidrolisáveis são naturais da uva, presentes na casca e sementes, enquanto os condensados são encontrados na madeira de carvalho (CERBARO, et al., 2016).

A liberação do tanino para ser usado tem como objetivo facilitar a precipitação de matérias proteicas em excesso e auxiliar nos processos de clarificação. Outros usos têm sido descritos, na melhora da qualidade dos vinhos, dadas as propriedades na melhora do corpo, na eliminação de aromas e gostos atribuídos a fenômenos de redução, na estabilização da cor e na melhora de aromas, outra propriedade muito importante é sua capacidade anti-radical livre e de consumo de oxigênio diluído (CERBARO, et al., 2016).

Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos sendo os taninos elágicos muito mais frequentes que os gálicos. Uma característica importante para os taninos hidrolisáveis é que possuem um precursor imediato comum, tanto para os galataninos como para os elagitaninos: o  $\beta$ - 1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glicose. Os galataninos são formados a partir de ligações meta-depsídicas dos ácidos gálicos com o precursor imediato. Enquanto os elagitaninos, são formados pelo acoplamento dos ácidos elágicos ao precursor imediato (BARBOSA, 2014).

Provavelmente, devido à habilidade de ligar-se às proteínas e outras macromoléculas, os taninos apresentam atividades tóxicas, onde verificaram que a rápida mortalidade de insetos tratados com taninos condensados parece ser devido à atividade tóxica destes compostos e não pela inibição da digestibilidade. Contudo elagitaninos dímeros são mais adstringentes que os monômeros, deste modo, se a toxicidade é devido a sua adstringência, a alta toxicidade está intimamente associada ao maior peso da molécula. Um outro mecanismo de toxicidade, que pode envolver

os taninos, deve-se ao fato desses complexarem-se com facilidade a íons metálicos nos sistemas biológicos, incluindo microrganismos, que necessitam de íons metálicos como cofatores enzimáticos. Por exemplo ratos tratados com bebidas ricas em compostos fenólicos tiveram redução da absorção de ferro (MONTEIRO,2005).

Níveis elevados de tanino ingerido pelos animais podem produzir toxicidade e até causar a morte (MAKKAR, 2003). Estudo realizado sobre a gestação em ratas Wistar com a administração do Sanativo (fitoterápico rico em tanino) por via oral nas doses de 335 e 1675 mg/kg demonstrou uma redução de massa corporal da mãe observada na organogênese correlacionada à presença dos altos teores de taninos que o compõe (LYRA, 2007). Com isso a presença de taninos sugere uma possível toxicidade, o que merece ser investigado, dado o seu potencial uso terapêutico e na alimentação animal (SALES, 2011).

## **2.2 ESTUDO DA TOXICIDADE SISTÊMICA**

A toxicologia é definida como o estudo dos efeitos adversos das substâncias químicas sobre os organismos vivos, fundamenta-se fortemente nos campos da química e da biologia, e busca uma compreensão detalhada dos efeitos tóxicos e dos meios para evitar ou reduzir a toxicidade (SHIBAMOTO et al.,2014). Os ensaios de toxicidade consistem em expor organismos-teste representativos no ambiente a várias concentrações de uma ou mais substâncias, durante determinado período de tempo, e avaliar o efeito causado através de respostas nos organismos, determinando assim o seu potencial tóxico (COSTA et al.,2015).

Os efeitos tóxicos vão desde a mortalidade até efeitos chamados subletais, tais como mudanças no crescimento, na reprodução, no comportamento, entre outros (MELO,2015). A ausência de morte ou sinais de maior significância indica substância como “pouco tóxico” ou “quase não tóxico” (OECD, 2001).

Em estudos de toxicidade para o desenvolvimento e reprodução, a água consumida pelos animais é um forte indicador do potencial tóxico de uma substância, pois alguns investigadores atribuem alterações no paladar devido ao composto testado quando ocorre redução no consumo de água e quando conseqüente desidratação é observada nos grupos testes. O consumo reduzido de água que

contém compostos tóxicos levanta questões sobre os efeitos indiretos da redução do consumo de fluido materno por filhotes durante a amamentação resultante da falta de qualidade, versus efeitos diretos do composto de teste (CAMPBELL et al., 2009).

A toxicidade sistêmica de uma substância ainda pode ser observada por meio da alteração comportamental, apatia, má condição de pelagem e alteração da massa relativa dos órgãos. O peso corporal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal (BARBOSA,2014).

A toxicologia estuda a ação de compostos químicos e outros xenobióticos sobre os organismos, com ênfase especial nos efeitos adversos ou danosos em órgãos específicos realizada através de exames macroscópicos, biometria dos órgãos e histopatologia dos tecidos (BAILEY et al., 2004; FERNANDES,2005). Alterações nas massas dos órgãos têm sido aceitas como indicadores de efeitos relacionados ao tratamento, até mesmo na ausência de mudanças morfológicas, contribuindo para identificação de órgãos associados aos efeitos tóxicos de uma substância (WOLFSEGGGER et al., 2009).

Para se obter um grau de segurança através do uso de qualquer substância, os testes toxicológicos são realizados para obter dados sobre as condições em que os agentes químicos produzem efeitos tóxicos, qual a natureza desses efeitos e quais os níveis seguros de exposição. Evidências toxicológicas demonstram que toda substância é agente tóxico em potencial, dependendo apenas das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo, frequência e via de administração (PIRES JÚNIOR et al.,2012).

Os estudos de toxicidade de dose repetida têm como objetivo caracterizar o perfil toxicológico da substância após a administração repetida. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, patologia, histopatologia, além da determinação do No Observed Effect Level (NOEL). Estes estudos podem ter durações menores – *Short-term* - (por exemplo, 14 e 28 dias) ou envolver um período mais extenso de administração da droga – *Long-term* - (por exemplo, 90 dias, 180 dias). Geralmente 3 doses são utilizadas, sendo a mais alta escolhida com a expectativa de produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não morte nem sofrimento intenso e respeitando-se o limite máximo de 1000 mg/kg/dia em roedores e

nãoroedores. As demais doses são estabelecidas em sequência descendente sugerindo intervalos de 2 a 4 vezes (SOBRAL, 2006; ANVISA, 2013).

Em trabalho realizado com o ácido elágico (AE), a DL50 da substância em camundongos não foi determinada devido à ausência de morte no período de 24 horas após a administração de 25 a 1500 mg/kg de AE por v.o ou intraperitoneal (25 a 1000 mg/kg). Como não houve letalidade dos animais em nenhuma das vias de administração e doses testadas, esses resultados sugerem uma baixa toxicidade para o ácido elágico, necessitando assim de estudos posteriores. (BESERRA et al., 2010).

### **2.3 ESTUDO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA NAS FÊMEAS**

Sobre o uso de substâncias químicas presentes no meio ambiente há grande interesse científico devido suas ações que podem interferir no sistema endócrino de humanos e outros animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução. Essas substâncias são conhecidas como Desreguladores Endócrinos (DEs) (DEZOTTI; BILA, 2007). Os DEs interferem com a produção, secreção, metabolismo, transporte e ação periférica de hormônios endógenos. Sua interferência com a ação hormonal deve-se, sobretudo à ligação a receptores hormonais e, por meio desta ação, podem desencadear dois tipos de resposta, representadas pelo efeito agonista, que mimetiza a ação hormonal, ou pelo efeito antagonista, que impede a ligação do hormônio natural ao seu sítio de ação (COSTA, 2014).

Desregulador endócrino é caracterizado como uma substância exógena ou mistura que altera uma ou mais funções do sistema endócrino, bem como a sua estrutura, causando efeitos adversos tanto no organismo exposto como na sua prole (BACHEGA et al., 2011). Segundo a União Europeia (UE), os desreguladores endócrinos podem: danificar diretamente um órgão endócrino; alterar diretamente a função de um órgão endócrino; interagir com um receptor de hormônios ou, alterar o metabolismo de um hormônio em um órgão endócrino (DEZOTTI; BILA, 2007).

A toxicidade reprodutiva está relacionada à interferência tóxica sobre o sistema reprodutor de qualquer espécie com capacidade reprodutiva tanto de machos quanto de fêmeas, incluindo o desenvolvimento pré-natal (SANTOS, 2009; BARROS, 2011).

Diversas substâncias químicas podem alterar o funcionamento do sistema endócrino. Para a realização de triagem e programas de testes para detectar agentes

capazes de desregular o sistema endócrino, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA – United States - Environmental Protection Agency) instituiu, no ano de 1998, o Comitê Consultivo de Testes e Triagem dos Desreguladores Endócrinos (EDSTAC – Endocrine Disrupters Screening and Testing Advisor Committe) que propõe e valida testes que caracterizem o potencial dessas substâncias. De maneira semelhante, a Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OECD – Organization for Economic Cooperation and Development) vem trabalhando em validação de métodos para detecção de desreguladores endócrinos (MÜLLER,2007).

A fertilidade, a reprodução e o desenvolvimento fetal são essenciais para sustentar uma espécie, o que torna relevante qualquer estudo relacionado a substâncias que venha a ter uma ampla utilização sem o maior conhecimento sobre sua ação reprodutiva (no sistema reprodutivo). As mulheres têm apenas cerca de 400 folículos que atingem a maturidade e passam pela ovulação durante a vida, o que significa que há uma oportunidade limitada de reprodução. Além disso, os órgãos reprodutores femininos, incluindo o útero e os ovários, apresentam crescimento periódico e regeneração regulado por hormônios. O sistema de controle hormonal possui funções dinâmicas e é suscetível ao estresse fisiológico causado por partículas estranhas e qualquer interrupção na reprodução feminina pode resultar em anomalias fetais (BROHI, et al.,2017).

Geralmente os testes de avaliação da toxicidade reprodutiva compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento e, continuamente até a sua maturidade. Com isso fazendo-se necessário para o esclarecimento de estudos das mais diversas substâncias existentes. (HOLLENBACH et al., 2010).

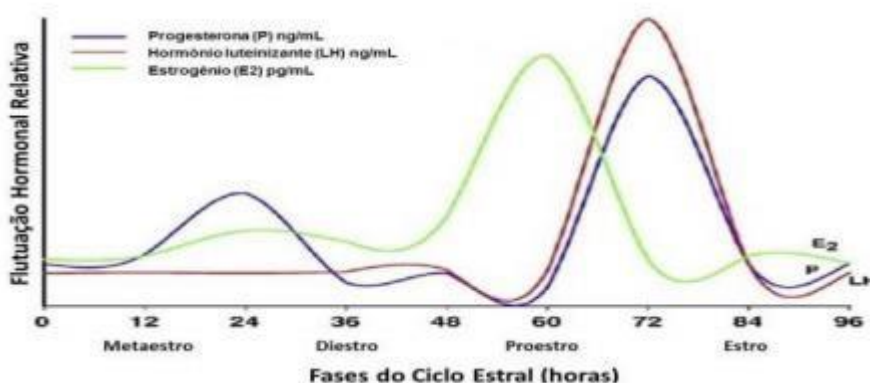
Através desses estudos é que podemos compreender o melhor funcionamento dos órgãos reprodutivos e possíveis alterações que possa vir a existir, com isso entende-se por reprodução o processo biológico que assegura a continuidade das espécies, propiciando que o material genético existente seja passado às gerações seguintes. Dessa forma, o ciclo reprodutivo não manuseia 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 se torna capaz de procriar (MELLO, 2007).



O ciclo reprodutivo pode ser afetado por substâncias químicas em qualquer das suas diferentes fases, impedindo ou inibindo temporariamente a reprodução e/ou causando defeitos de desenvolvimento na prole exposta. Nas fases pré e pós-natal, os órgãos sexuais e o sistema nervoso central que ainda estão se diferenciando, podem ser atingidos por substâncias presentes no sangue materno através da placenta durante a gestação ou através do leite durante a lactação. Diante disso os estudos de toxicidade reprodutiva devem ser igualmente abrangentes para que se possam detectar diferentes tipos de agravos nas diferentes fases do ciclo reprodutivo (SANTOS, 2017).

Os aparelhos reprodutores de fêmeas possuem morfofisiologia que varia de acordo com a espécie e com fatores como idade, estação do ano, luminosidade e substâncias ingeridas pela fêmea, notadamente as que se ligam aos receptores hormonais ou as que modificam expressão de hormônios/receptores, podendo induzir variações ou irregularidades no ciclo estral (ABRAMS, 2007).

O ciclo estral de ratas compõe um meio natural e repetitivo para estudar as variações dos hormônios esteroides e suas ações fisiológicas. Muito do conhecimento que há sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos que possuem ovulação espontânea é baseado em estudos sobre o ciclo estral da rata (GEHLEN, 2009). Nas fêmeas de roedores, o ciclo estral dura 4-5 dias e consiste em 4 fases: proestro (P), estro (E), metaestro (M) e diestro (D), embora normalmente o metaestro e o diestro são conhecidos como diestro I (DI) e diestro II (DII) respectivamente. Há uma onda característica da progesterona, prolactina, estradiol, hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante, e, portanto, mudanças comportamentais induzidas pelas variações hormonais do ciclo estral (ESKELUND, et al., 2016). A figura 2 relata as flutuações hormonais do ciclo estral de ratas.

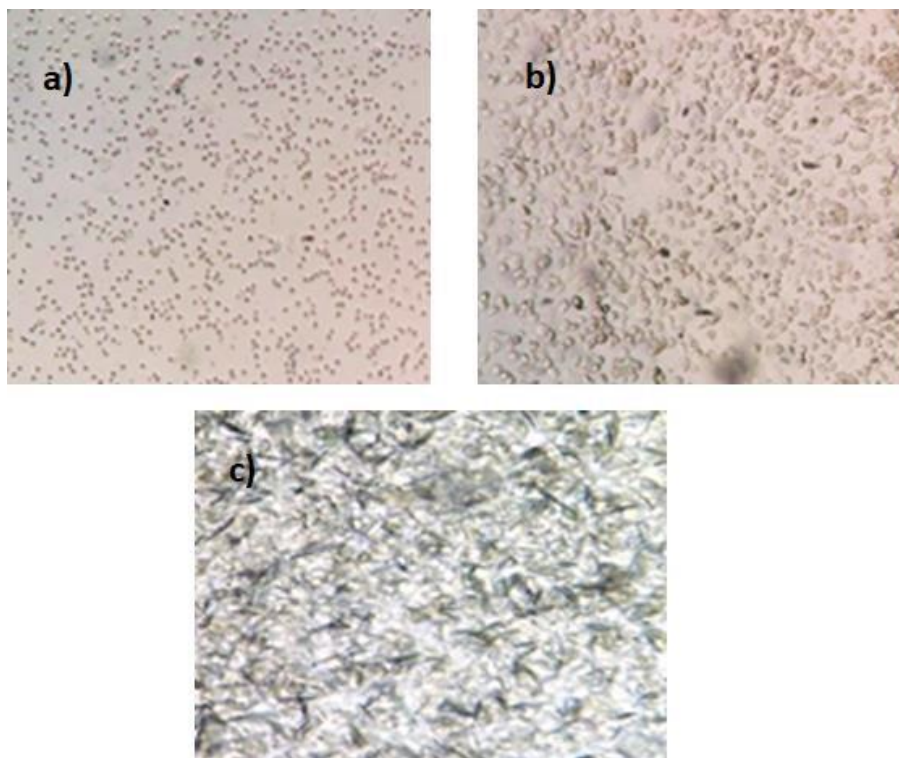


**Figura 2** – Ciclo estral de ratas e suas variações hormonais.

Fonte: SANTOS,2017

O estro dura cerca de 12 a 14 horas, estendendo-se do início da manhã até o início da noite, quando o nível de estrógeno aumenta visivelmente seguido por um aumento de secreção de progesterona: esse aumento hormonal desencadeia a ovulação, a rata já começa a exibir comportamento de lordose característico da fase do estro até o final do estro. Os hormônios voltam aos seus níveis basais quando acontece a ovulação (estro) no quarto dia, seguido por um pico temporário de estradiol na noite do estro (CALLEGARI,2008).

A determinação do ciclo estral é imprescindível em procedimentos de pesquisa, pois, além de evitar uma série de vieses devido a alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo, permite conseguir grupo mais homogêneo, importante em alguns tipos de ensaios. A caracterização de cada fase do ciclo se baseia na proporção entre três tipos celulares observados no esfregaço vaginal: leucócitos, células arredondadas nucleadas e células epiteliais cornificadas, representado na figura 3. O monitoramento do ciclo estral permite a realização de ensaios sobre aspectos do ciclo reprodutivo, a influência de fatores ambientais sobre a reprodução e a ação de substâncias potencialmente teratogênicas sobre a progênie (VILELA et al., 2007; BARRIL, et al., 2016).



**Figura 3** – Esfregaço vaginal apresentando leucócitos (a), células arredondadas nucleadas (b) e células epiteliais cornificadas (c).

Fonte: Arquivo pessoal

Assim, o emprego de ratas como modelo animal para triagem endócrina é importante, não apenas pela infinidade de informações sobre o controle endócrino da função reprodutiva e desenvolvimento que envolvem reprodução humana, como também pelas evidências dos efeitos de substâncias tóxicas que alteram o sistema endócrino, além de se justificar pela existência de algumas similaridades no comportamento reprodutivo das duas espécies, que não são compartilhadas por todos os mamíferos. Dentre essas semelhanças, podem ser ressaltadas: o intervalo temporal entre o coito e a implantação do blastocisto no útero, de 4 a 6 dias, e a deciduação, que é a formação do componente maternal da placenta, caracterizada por uma íntima relação entre as circulações materna e fetal (GRAY et al., 2004).

As fêmeas de roedores e humanos compartilham também o tipo de placenta, denominada hemocorial, caracterizada por uma maior invasão tissular da mucosa uterina pelos vilos coriônicos e íntimo contato entre placenta e tecido uterino, o que favorece a passagem de algumas substâncias químicas lipossolúveis e de baixo peso molecular da circulação materna para a fetal (FLORIO; SOUSA, 2006).

Durante a gestação, a utilização de qualquer medicamento deve ser feita com cuidado, já que algumas substâncias tóxicas podem atravessar a barreira placentária e interferir no desenvolvimento embriofetal, muitas vezes de forma negativa. Esse mesmo cuidado deve ser aplicado ao uso de plantas medicinais ou outro meio natural, principalmente devido à falta de informações sobre os mesmos (LOURENÇO et al., 2009).

Do ponto de vista científico pesquisas mostram que muitos alimentos possuem substâncias agressivas ao organismo e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (POZZATTI et al., 2010). Mesmo com todos os riscos que são informados, o uso de medicamentos durante a gestação é um evento frequente, e as causas de sua utilização incluem o tratamento das desordens clínicas que ocorrem durante o período gestacional, doenças crônicas ou intercorrentes e a própria medicação (LOURENÇO, et al., 2012).

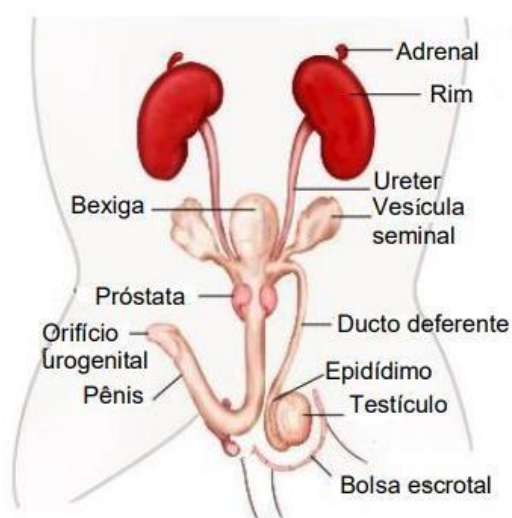
Além disso, os fármacos podem alterar o desenvolvimento do feto através de uma grande variedade de mecanismos, por exemplo, se o medicamento atravessa a placenta, o que ocorre com a maioria das drogas ingeridas, então ele pode atuar diretamente sobre o feto. Os fármacos também podem atuar diretamente sobre o útero e / ou sobre a placenta tendo como efeitos alteração da atividade secretora da placenta ou fluxo sanguíneo útero - placentária, por exemplo. Finalmente também podem produzir efeitos sobre a fisiologia da mãe que podem influenciar secundariamente o feto, tais como aumento da secreção de hormônios do estresse ou comportamentos de saúde materna alterados atribuídos a dependência da mãe (ROSS et al., 2015).

Até meados do século passado, acreditava-se que o útero proporcionava um ambiente protegido para o feto, e um escudo contra o ambiente externo. No entanto, quase todas as drogas ou substâncias químicas administradas à mãe são capazes de atravessar a placenta, em certa medida, a menos que seja metabolizado ou alterados durante a passagem, ou então seu tamanho molecular e baixa lipossolubilidade não permitem transferência transplacentária (ESHKOLI et al., 2011).

Cada um dos sistemas em formação apresenta um período crítico específico em que se encontram mais suscetíveis ao agente e, quanto maior for o período de exposição à substância, maior também será a suscetibilidade (BERNARDI, 2014). Os períodos críticos do desenvolvimento do rato estão ilustrados na Figura 4.



O sistema reprodutor dos mamíferos, a exemplo dos ratos, modelo experimental escolhido para a realização do experimento, é formado por glândulas e ductos responsáveis pela produção, transporte e eliminação dos gametas masculinos (espermatozoides) e, pela produção e secreção de testosterona. Esse sistema é formado pelas gônadas (testículo), epidídimo, canais deferentes, ducto ejaculador, uretra, pênis e glândulas acessórias, que incluem as vesículas seminais, a próstata e as glândulas uretrais (SANTOS,2012). A figura 5, retrata o sistema urogenital de rato.



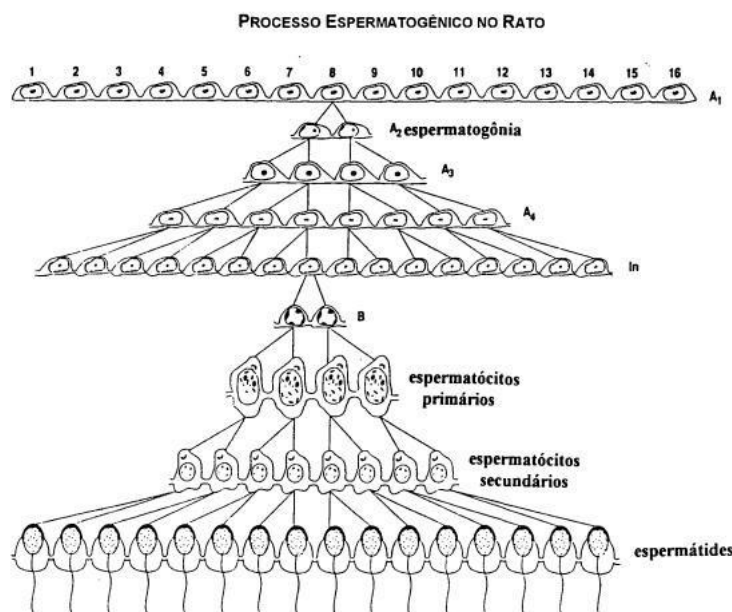
**Figura 5** – Sistema urogenital de rato. Fonte: SANTOS,2012

Para o estudo de fertilidade nos machos o principal órgão a ser estudado é o testículo, por ser responsável pela produção de espermatozoides e andrógenos. São órgãos pares revestidos por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo denso, a albugínea testicular, a qual emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino, dividindo o testículo em lóbulos. Histologicamente e funcionalmente, o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos, intertubular e tubular. O intertúbulo de ratos é constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, células de Leydig e células do tecido conjuntivo, como macrófagos, fibroblastos e suas fibras colágenas. A célula de Leydig é o tipo celular mais frequente, responsável pela produção de andrógenos, principalmente testosterona, a qual pode ser posteriormente convertida em uma variedade de outros esteroides (LIMA,2013; NASCIMENTO, 2017).

Os espermatozoides saem dos testículos imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito, eles só adquirem motilidade e capacidade fecundante após sua passagem pelo ducto epididimário e epidídimo, responsável pela maturação espermática. Agentes tóxicos que venha a alterar a fisiologia destes órgãos podem causar redução na produção e viabilidade espermáticas, influenciando na fertilidade (LIMA, 2013).

O epidídimo consiste de um longo ducto, altamente contorcido, que conecta os ductos eferentes ao ducto deferente. Morfologicamente, o epidídimo é geralmente dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda (OLIVA et al., 2009). Cada região do epidídimo apresenta funções distintas, sendo que o segmento inicial está relacionado com a absorção de fluidos vindos do testículo, as regiões da cabeça e corpo estão envolvidas com os processos iniciais e tardios de maturação espermática, como a aquisição da motilidade progressiva e da capacidade de reconhecimento e fertilização do ovócito, enquanto que a região da cauda está associada com o armazenamento espermático e com a fagocitose de espermatozoides anormais (ROBAIRE; VIGER, 1995; CORNWALL, 2009).

A espermatogênese é um processo complexo e sincronizado que ocorre nos túbulos seminíferos e dura cerca de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (COSTA et al., 2003). As células-tronco masculinas (chamadas espermatogonia) produzem espermatozoides sob a influência dos hormônios esteroides, através de sucessivas mitoses, meiose e a diferenciação de espermátides haploides. De acordo com características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: 1) fase proliferativa ou espermatogoniogênese, na qual as espermatogônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; 2) a fase meiótica ou espermatocitogênica, onde cada espermatócito dará origem a quatro espermátides haploides e durante a qual ocorre uma divisão reducional e outra equacional; 3) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde cada espermátide arredondada passa por mudanças estruturais e bioquímicas diferenciando-se em espermatozoide, um tipo celular especializado para alcançar e fertilizar o ovócito. A primeira e a terceira fases apresentam aspectos morfológicos que são espécie-específicos, enquanto a fase espermatogênica ou fase meiótica possui características morfológicas comuns nas várias espécies de mamíferos (HERMO et al., 2010; FRANÇA; RUSSELL, 1998; ALMEIDA, 1997). O processo espermatogênico no rato está ilustrado na figura 6.



**Figura 6** – Espermatogênese no rato.

Fonte: RUSSELL, et al., 1990

O reconhecimento dos diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero é essencial para a realização de estudos quantitativos da espermatogênese. É importante para que se tenha uma compreensão da espermatogênese normal bem como para a determinação de fases específicas do processo que possam ser afetadas por um determinado tratamento ou droga (PANNOCCHIA et al., 2008.)

A infertilidade masculina é uma síndrome multifatorial que abrange uma grande variedade de desordens, que podem ser congênitas ou adquiridas. Indivíduos expostos durante período críticos de desenvolvimento são mais vulneráveis à ação de substâncias químicas em função de menor capacidade metabólica e excretora e da ausência de muitos mecanismos de retroalimentação do sistema endócrino. O uso de substâncias em machos pode resultar em uma série de alterações que podem ser relatados através de estudos. O tratamento dos machos antes da concepção pode resultar em infertilidade, morte embrionária e anomalias não específicas, bem como em redução do peso ao nascer, diminuição do tamanho da ninhada e retardo no desenvolvimento pós-natal (HOLLENBACH, et.al, 2010).

### 3 OBJETIVOS



### 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi investigar os possíveis efeitos da administração oral do ácido elágico (AE) sobre os parâmetros reprodutivos e sistêmicos de ratos Wistar machos e fêmeas.

### 3.2 Objetivos específicos

- Observar a influência do ácido elágico sobre fertilidade e espermatogênese em ratos Wistar;
- Observar a influência do ácido elágico sobre o ciclo estral de ratas Wistar;
- Verificar o efeito do ácido elágico sobre a prenhez e a lactação de ratas Wistar;
- Avaliar cada ninhada quanto a presença de filhotes nascidos mortos, nascidos vivos, tamanho em relação ao grupo controle e de anormalidades grosseiras;
- Avaliar a toxicidade sistêmica do ácido elágico através de análises histopatológicas.

## 4 ESTRUTURAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: Uma introdução, revisão de literatura, Capítulo I e II contendo os artigos intitulado “**Avaliação do efeito do ácido elágico sobre o sistema reprodutor e outros sistemas orgânicos de**

**ratos wistar” e “Avaliação do efeito do ácido elágico sobre o sistema reprodutor e outros sistemas orgânicos de ratas wistar”** a serem encaminhados para publicação no periódico **Toxicology and Applied Pharmacology – qualis: A2 para zootecnia e recursos pesqueiros e fator de impacto: 3.791**. Os artigos foram estruturados de acordo com as normas técnicas da mesma.

## **CAPITULO I - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR E OUTROS SISTEMAS ORGÂNICOS DE RATOS WISTAR**

Jamilly Érica Sousa Campelo<sup>1</sup>, Emanuelle Karine Frota Batista<sup>1</sup>, Daniela Kunkel<sup>1</sup>,  
Raphael Briseno Frota<sup>1</sup>, Emanuela Ribeiro Moura<sup>1</sup>, Silvéria Regina Lira<sup>1</sup>, Amilton  
Paulo Raposo Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela,  
Campus Socopo-CCA, Teresina, PI, Brasil. CEP 64049-550. \*Autor para  
correspondência: [jamilly\\_ericahotmail.com](mailto:jamilly_ericahotmail.com)

---

<sup>1</sup> Autor correspondente: Jamilly Érica Sousa Campelo, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Campus Socopo-CCA, Teresina, PI, Brasil. CEP 64049-550. Endereço de e-mail: [jamilly\\_ericahotmail.com](mailto:jamilly_ericahotmail.com)

## RESUMO

O ácido elágico é um composto fenólico responsável por diversas atividades biológicas tais como antioxidante e/ou anticarcinogênica e está presente algumas frutas e nas nozes. O objetivo deste estudo foi investigar os possíveis efeitos do ácido elágico (AE) sobre o sistema reprodutor e outros sistemas orgânicos de ratos induzidos pela administração oral. Para os protocolos experimentais realizados foram utilizados 40 ratos Wistar machos divididos em 4 grupos de acordo com as doses do AE: grupo controle (água destilada) / (GC) e os grupo tratamentos de 3, 10 e 30 mg/kg do AE. Foram realizados os seguintes testes: consumo de água e ração, massa corpórea, alterações comportamentais, coleta e pesagem dos órgãos e avaliação da fertilidade. Para análise estatística utilizou-se o *software* GraphPad Prism® 5.03, aplicando ANOVA seguida pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ). Os resultados demonstraram que o AE não alterou o ganho de peso dos animais tratados, porém houve uma diminuição na massa relativa do baço e rins no grupo de 30 mg/kg quando comparado ao GC, no entanto, os animais não apresentaram sinais comportamentais de toxicidade. Não houve alteração significativa nas variáveis: capacidade de fertilização e morfologia espermática. A concentração espermática teve redução significativa nos grupos de 10 e 30 mg/kg em relação ao grupo controle, porém a análise histopatológica dos órgãos reprodutivos não apresentou alterações quando comparado ao GC. Conclui-se que o ácido elágico possui toxicidade reprodutiva, sem provocar infertilidade.

Palavras-chave: testículo; fertilidade; sêmen; fertilização.

## ABSTRACT

Ellagic acid is a phenolic compound that is present in some fruits and nuts and has several known biological activities, such as antioxidant and anticarcinogenic. The objective of this study was to investigate the possible effects of ellagic acid (EA) on the reproductive system and other organ systems of rats by oral administration. For the experimental protocols, 40 male Wistar rats were divided into 4 groups according to the AE dose: control group (distilled water) / (GC) and the 3, 10 and 30 mg / kg EA treatments. The following tests were performed: water and feed intake, body mass, behavioral changes, organ collection and weighing, and fertility assessment. For statistical analysis, GraphPad Prism® software 5.03 was used, applying ANOVA followed by SNK test ( $p < 0.05$ ). The results demonstrated that EA did not alter the weight gain of treated animals. There was a decrease in the relative mass of the spleen and kidneys in the 30 mg / kg group when compared to GC, however, the animals showed no behavioral signs of toxicity. There was no significant change in fertilization capacity or sperm morphology. The sperm concentration had a significant reduction in the 10 and 30 mg / kg groups in relation to the control group. The histopathological analysis of the reproductive organs showed no alterations when compared to the CG. It is concluded that ellagic acid has reproductive toxicity, without altering fertility in a subchronic protocol.

Keywords: testis; fertility; semen; fertilization.

## INTRODUÇÃO

O uso de substâncias presentes em diversas plantas e frutas merece um cuidado e uma ampla investigação das possíveis alterações no organismo animal, que essas substâncias podem provocar. Há um crescente interesse em entender o papel e o mecanismo dos fitoquímicos: polifenóis, flavonoides e fenilpropanoides como inibidores do estresse oxidativo. Entre todos os fitoquímicos, o ácido elágico (AE) tem recebido o máximo de atenção por causa de sua gama de propriedades biológicas. É principalmente abundante em nozes, romã, oxococo e outros alimentos vegetais, sob a forma de taninos hidrolisáveis chamados elagitaninos (Devipriva et al.,2007).

O ácido elágico representa o mais alto valor bioativo agregado da romã, devido as muitas propriedades biológicas, incluindo antimutagênico, atividade anticancerígena, preventiva do aparecimento de doenças cardiovasculares, distúrbios dislipidêmicos e estimulação da cicatrização de feridas e manutenção da elasticidade da pele (Zhao et al., 2013). Assim, o AE tem um grande potencial em tecnologia alimentar como agente nutracêutico para melhorar a qualidade dos alimentos e na indústria farmacêutica como medicamento e cosmético (Verotta et al.,2017)

Tendo em vista o significativo uso do AE como medicamento e cosmético, faz-se necessária uma melhor investigação de sua toxicidade reprodutiva e sistêmica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Substância Química**

Ácido elágico foi adquirido da empresa de representação de produtos farmacêuticos (ActivePharmaceutica, Santa Catarina, Brasil), tendo como o país de origem a China, com teor do ácido elágico foi de 92,1% identificado pelo processo de

separação de compostos químicos em solução, através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### **Animais**

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) fêmeas e machos virgens (90 ± 8 dias de vida, 180-200 g), obtidos no Biotério Central da UFPI (CCA) mantidos em gaiolas-padrão de polipropileno de 49x31x21cm (3 a 4 animais/ gaiola), forradas com cama de xilana, trocadas duas vezes por semana, e com água potável e ração *ad libitum*. Os animais foram mantidos na sala de experimentação do mesmo Biotério, em ambiente climatizado 22 ° C (± 3 °) e umidade relativa de 50-60%, com ciclo claro-escuro de 12 h e com sistema de exaustão com 15 a 20 trocas de ar/h controlando a dispersão de amônia no ambiente. Os protocolos experimentais foram executados de acordo com as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Todos os procedimentos foram submetidos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI, mediante o parecer nº 263/16, antes de sua execução.

### **Protocolo experimental**

Visando avaliar o efeito do ácido elágico (AE) na reprodução de machos, foram utilizados 40 ratos Wistars adultos e saudáveis selecionados aleatoriamente os quais foram mantidos com 40 ratas adultas, na proporção de uma fêmea para um macho por gaiola e distribuídos em 4 grupos (n=10) sendo o grupo controle tratado com água destilada e três grupos tratados nas doses 3, 10 e 30mg/kg do ácido elágico, pelo método de gavagem durante 28 dias seguidos, sendo duas semanas antes do acasalamento, uma semana correspondente ao período de acasalamento e uma

semana após o acasalamento, para avaliação da toxicidade sistêmica e reprodutiva (OECD 421, 2015). As doses utilizadas foram baseadas em estudos já realizados com ácido elágico em machos (Beserra,2010).

### **Toxicidade sistêmica**

Concomitantemente ao tratamento, os animais foram avaliados, quanto à toxicidade sistêmica segundo os parâmetros: consumo de água e ração, massa corpórea, alterações comportamentais, avaliação macroscópica e microscópica dos órgãos.

### **Consumo de água e ração**

O consumo de água (mL) e ração (g) dos animais tratados foi aferido por gaiola individual duas vezes por semana após o início do tratamento durante os 28 dias. Foi oferecido a cada gaiola 400g ração e 700mL de água e, no momento da reposição, foram reavaliadas as quantidades restantes de água e ração. O consumo de cada animal foi registrado a partir da diferença entre a quantidade oferecida e o restante registrado.

### **Massa corpórea**

Os animais foram pesados no início e no final do período de 28 dias do tratamento (dias 1 e 28).

### **Alterações comportamentais**

Foram avaliados os parâmetros: piloereção, perda de pelos, tremores, salivação, convulsões, hipoatividade ou hiperatividade, redução do consumo de ração, diarreia e mortalidade.



### **Avaliação macroscópica e microscópica dos órgãos**

No 29º dia os animais machos foram eutanasiados por sobredose de anestésico (Tiopental sódico 150mg/kg e Lidocaína 10mg/kg, via IP) para coleta e avaliação dos órgãos internos. Os órgãos removidos foram: coração, pulmão, baço, fígado, rins, adrenais, testículos, epidídimos e vesículas seminais e seus pesos relativos ao peso corporal foram determinados, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Peso relativo (g/100g): } \frac{\text{peso do órgão (g)}}{\text{peso corporal final do animal (g)}} \times 100$$

Os segmentos dos órgãos reprodutivos foram fixados em formol tamponado (solução de formol a 10% tamponada), sendo que os testículos foram fixados por imersão em fixador de Bouin e após 24 horas, resseccionados para processamento histológico no qual foram desidratados com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanizados em xilol, submetidos a impregnação e inclusão em parafina (Bacha; Wood, 1990). Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em fatias com espessura de 3,0 µm e subseqüentemente submetidos à coloração com hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio de luz (OECD, 2015).

### **Toxicidade reprodutiva**

**Tempo de fecundação:** A fertilidade do macho foi avaliada com base na capacidade de fecundação, observada durante o período do acasalamento de sete dias, na proporção de um macho para uma fêmea onde avaliou-se a presença de espermatozoides (sptz) nos lavados vaginais durante o tempo avaliado.

**Concentração e morfologia espermática:** Os espermatozoides foram obtidos da cauda do epidídimo. Para isso, após pesagem dos epidídimos, foi realizada a fragmentação das duas caudas inteiras, por meio de cortes com tesoura e pinça, em pequenos pedaços e homogeneização em 10 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%. Do homogeneizado resultante foi retirado um volume correspondente a 1 mL que foi adicionado a um béquer com 9 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% formando uma suspensão diluída do homogeneizado. Dessa suspensão foi retirado o volume de 1 mL que foi utilizado para avaliação da morfologia dos espermatozoides bem como sua concentração. A contagem dos espermatozoides foi feita em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico em aumento de cem vezes e dos valores obtidos foi calculada a média dos quatro campos e multiplicada pelo fator de correção ( $3 \times 0,520833$ ) conforme metodologia proposta por Robb (1978).

### **Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Student Newman-Keuls* (SNK) ( $p < 0,05$ ), utilizando o *software* GraphPad Prism® 5.03.

## **RESULTADOS**

### **Toxicidade sistêmica**

#### **Massa Corpórea, consumo de água e ração**

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que, no desenvolvimento ponderal, os ratos não tiveram diferença significativa entre os grupos tratamento nas doses de 3, 10, 30 mg/kg quando comparados ao grupo controle (Tabela 1).

**Tabela 1:** Massa corpórea, consumo de água e ração e ganho de peso dos ratos após 28 dias de administrações do ácido elágico nas diferentes doses.

Grupo	Dose mg/Kg de ração	Consumo		Massa corporal		Ganho de peso (g)
		Consumo de ração	Consumo de água	Dia 1	Dia 28	
Controle	H <sub>2</sub> O	183,7±15,37	295,9±38,75	257,8±5,27	286,9±6,89	29,1
	3	172,7±15,74	315,9±32,64	257,4±8,38	280,6±9,53	23,2
Ácido elágico	10	190,5±17,09	320,6±38,32	246,1±8,62	267,1±12,71	21,0
	30	139,1±26,44	350,7±44,29	252,6±5,90	275,7±7,27	23,1

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. Não houve diferença significativa.

### Aspectos macroscópicos dos órgãos

A análise macroscópica do coração, pulmão, baço, fígado, rins, adrenais, testículos, epidídimos e vesículas seminais não demonstrou alteração em sua cor e morfologia, fato que evidencia a incapacidade da substância em produzir alterações estruturais, perceptíveis visualmente, nesses órgãos.

### Massa relativa dos órgãos

Os resultados observados neste estudo mostraram uma diminuição na massa relativa do baço e rins no grupo tratado com 30 mg/kg do AE quando comparado ao grupo controle. Entretanto não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos avaliados quando comparados ao grupo controle (Tabela 2).

**Tabela 2:** Efeito da administração oral do ácido elágico sobre o peso relativo (g) [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] de ratos tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do Ácido Elágico (3, 10 e 30 mg/kg) ao final de 28 dias.

Órgão	Controle (H <sub>2</sub> O)	Ácido elágico		
		3 mg/Kg	10 mg/Kg	30 mg/Kg
Fígado	3,67±0,10	3,35±0,11	3,87±0,07	3,48±0,11
Baço	0,21±0,007	0,18±0,008	0,20±0,005	0,18±0,005 *
Coração	0,36±0,008	0,37±0,01	0,40±0,02	0,38±0,009
Rins	0,80±0,01	0,74±0,02	0,82±0,02	0,73±0,02 *
Pulmão	0,64±0,02	0,66±0,03	0,74±0,04	0,72±0,03
Adrenais	0,015±0,001	0,012±0,001	0,015±0,002	0,012±0,002
Testículos	1,10±0,03	1,07±0,04	1,19±0,05	1,19±0,03
Epidídimos	0,44±0,02	0,39±0,02	0,48±0,02	0,42±0,02
Próstata	0,31±0,03	0,24±0,01	0,29±0,03	0,25±0,01
Vesícula seminal	0,62±0,08	0,63±0,06	0,72±0,05	0,61±0,05

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. \* – quando difere do grupo controle.

### Sinais comportamentais de Toxicidade Sistêmica

Durante todo o procedimento experimental, não foram observados nos animais, sinais de toxicidade sistêmica, como: piloereção, perda de pelos, tremores, salivação, convulsões, hipoatividade, incoordenação motora, redução do consumo de ração ou

diarreia. Também não foi observada a ocorrência de mortes ou comportamentos anormais.

### Toxicidade reprodutiva nos machos

No teste de fecundação das fêmeas pelos machos, não foi possível avaliar estatisticamente pelo teste do qui-quadrado devido ao número reduzido de animais por tratamento (Tabela 3). Mesmo assim, observou-se uma redução de 25% do número de ratas fecundadas no grupo de 10mg/kg.

**Tabela 3:** Índice de fecundação (%) de ratos tratados com água destilada (controle) e diferentes doses do Ácido Elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante o período de acasalamento.

Grupo	Dose mg/Kg	Não fecundadas
Controle	H <sub>2</sub> O	00% (0/9)
Ácido elágico	3	00% (0/10) 25%
	10	(2/8)
	30	00% (0/8)

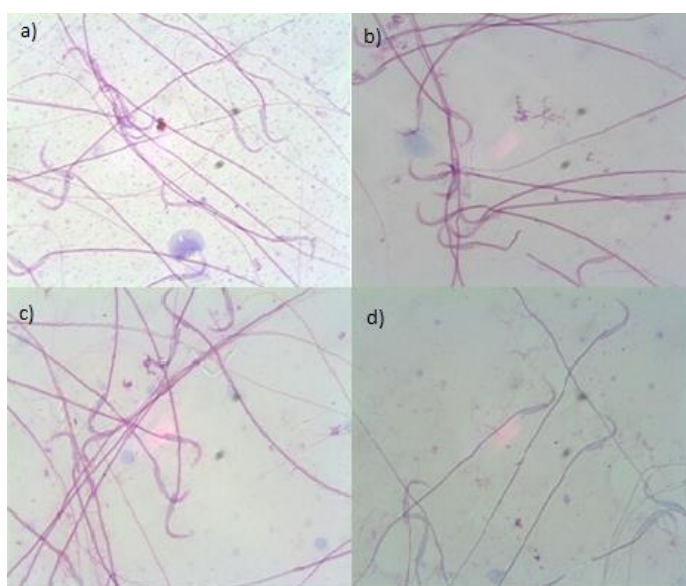
Observou-se uma redução significativa na concentração espermática nos grupos tratados com as doses de 10 e 30mg/kg quando comparados ao grupo controle (Tabela 4). Com relação a patologia espermática, não foram observadas anormalidades nos grupos tratados com AE (3,10,30 mg/kg) conforme figura 1.

**Tabela 4:** Avaliação espermática de ratos tratados com água destilada (controle) e diferentes doses do Ácido Elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante o período de tratamento (28 dias).

Grupo	Dose mg/Kg	Concentração espermática (x10 <sup>6</sup> )	Cabeça		Cabeça c/ contorno anormal	Cauda enrolada na enrolada cabeça		
			Cabeça pequena	Cabeça gigante				
Controle	H <sub>2</sub> O	8,31±0,15	0,60±0,27	0,20±0,13	0,60±0,22	0,30±0,15	0,60±0,30	0,10±0,10

Ácido elágico	<b>3</b>	8,34±0,13	0,30±0,21	0,70±0,33	0,60±0,34	0,30±0,15	0,20±0,13	0,40±0,30
	<b>10</b>	7,17±0,13*	0,30±0,21	0,30±0,15	0,20±0,13	0,10±0,10	0,10±0,10	0,10±0,10
	<b>30</b>	6,08±0,12*	0,90±0,43	0,30±0,15	0,0	0,20±0,13	0,20±0,13	0,20±0,13

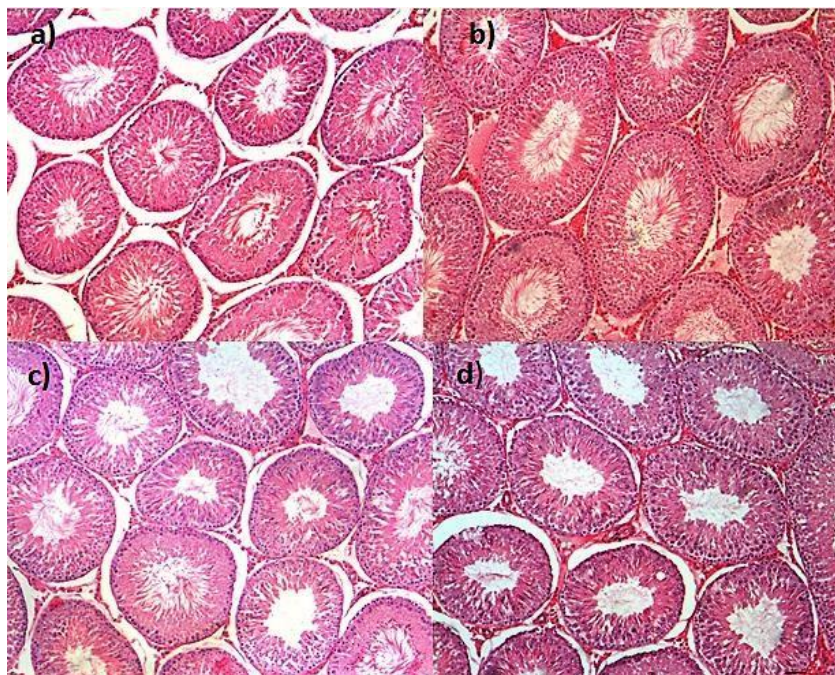
Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. \* – quando difere do grupo controle.



**Figura 1:** Morfologia espermática dos animais tratados com água destilada (controle) e nas doses de 3,10 e 30 mg/ do ácido elágico. a) - controle, b) - 3mg/kg de ácido elágico, c) - 10mg/kg de ácido elágico e d) - 30 mg/kg de ácido elágico. (Aumento 100x).

### Avaliação histopatológica

A análise histopatológica das seções dos testículos (Figura 2), epidídimos, próstatas e vesículas seminais de animais tratados com AE não demonstrou alterações estruturais quando comparados ao grupo controle.



**Figura 2:** Fotomicrografia de cortes histológicos dos testículos dos animais tratados com água destilada (controle) e ácido elágico nas doses de 3,10 e 30 mg/kg. a) - controle, b) - 3mg/kg de ácido elágico, c) - 10mg/kg de ácido elágico e d) - 30 mg/kg de ácido elágico. (Aumento 10x).

## DISCUSSÃO

Na literatura foram encontrados poucos registros de estudos sobre toxicidade reprodutiva e sistêmica do ácido elágico, assim este estudo buscou investigar possíveis efeitos tóxicos sobre órgãos reprodutivos e não reprodutivos de ratos após a administração oral do ácido elágico, visando embasar o seu uso terapêutico.

O ácido elágico (AE) tem vários efeitos conhecidos e por isso é promissor como fármaco para o controle da obesidade e dislipidemias. Yoshimura et al. (2013), por meio de experimento em que administraram ácido elágico em ratos, concluíram que o AE é um potente supressor da secreção de resistina, uma adipocitocina que liga a obesidade à diabetes tipo 2, melhora a dislipidemia e esteatose hepática, induzidas pela obesidade. Luo et al. (2016) também observaram diminuição no ganho de peso

em ratos tratados com uma dieta rica em gordura que passaram a receber suco de framboesa e a combinação de AE associado a cetona de framboesa.

Por ser um fármaco promissor faz-se necessário investigar possíveis efeitos tóxicos sobre os diversos sistemas orgânicos. Quanto à toxicidade sistêmica, na avaliação do consumo de ração e água, da massa corporal e ganho de peso (tabela 3), não foi observado diferença significativa entre os grupos tratados com ácido elágico em relação ao grupo controle. Outro estudo constatou redução do ganho de peso nos animais tratados oralmente com AE nas doses de 10 e 30 mg/kg (Beserra et al, 2010).

O peso de órgãos é amplamente aceito na avaliação de toxicidade, pois fornece informações preliminares dos órgãos, que podem indicar lesões nos sistemas dos quais eles fazem parte. No presente estudo encontrou-se diminuição no peso do baço e dos rins, essa alteração pode indicar a hipertrofia tubular ou nefropatia crônica progressiva (Sellers et al., 2007).

No presente experimento, com animais não expostos propositalmente a estresse oxidativo, os resultados encontrados demonstram que, no grupo tratado com 10 mg/kg, houve 25% de ratas que apresentaram estro e não foram fecundadas (2/8) (tabela 1). Observou-se ainda uma diminuição da concentração dos espermatozoides nos grupos tratados com 10 e 30 mg (tabela 2), sem alterar a morfologia espermática (figura 1). Na avaliação histopatológica não foram encontradas alterações morfológicas nos túbulos seminíferos (figura 2), esse resultado demonstra baixa toxicidade do ácido elágico sobre esse órgão, ficando restrito a uma alteração funcional, representada por uma redução na produção de espermatozoides, sem correspondente alteração morfológica detectável no exame histológico.



Por outro lado, alguns fármacos anticancerígenos como é o caso da cisplatina, ciclofosfamida e ciclosporina, assim como o anticonvulsivante volproato, possuem grande toxicidade sobre a função testicular e o ácido elágico foi objeto de estudos para efeito protetor contra tal toxicidade. Estudos mostram que o ácido elágico possui efeitos protetores sobre a toxicidade testicular da cisplatina (Turk et al., 2008) e da ciclofosfamida (Ceribasi, et al. 2010). Turk et al. (2010) verificaram que o AE, na dose de 10 mg/kg, atenuou os efeitos do estresse oxidativo da ciclosporina (15mg/kg) sobre os testículos de ratos, que incluíram: redução do peso dos testículos e próstata, diâmetro e espessura da camada de células germinativas dos túbulos seminíferos, assim como a presença de degeneração, necrose e redução da concentração e motilidade espermática. De modo semelhante, Girish et al. (2014) demonstraram que ratos Wistar machos tratados com o ácido elágico nas doses de 10, 25 e 50mg/kg foram eficazes na prevenção das anormalidades de espermatozoides induzidas por volproato de sódio de um modo dependente da dose. Resultados de outro estudo mostraram que o ácido elágico associado ao licopeno em ratos, previnem a apoptose testicular induzida por cisplatina, aparentemente por prevenir a peroxidação lipídica (Türk et al., 2011).

Conclui-se que os estudos de toxicidade reprodutiva e sistêmica em ratos Wistar, demonstraram que o AE causa redução na concentração espermática e diminuição do peso do baço e rins, sem que tenha sido observado sinal de toxicidade nos demais parâmetros. Assim, apesar do efeito protetor contra efeitos danosos de outras drogas sobre os testículos e os efeitos favoráveis contra a obesidade e síndrome metabólica, este experimento mostrou, de forma inédita, ter uma pequena toxicidade intrínseca, como visto pela redução da capacidade de cópula na dose de 10 mg/kg e da redução da concentração espermática na dose de 10 e 30mg/kg.

## **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa.

## **REFERÊNCIAS**

Beserra, A.M.S.S., Souza, M.C., Colodel, E.M., da Silva Jr., I. F., Lima, J.C. S., Silva, R.M., Martins, D.T.O. Avaliação toxicológica do ácido elágico em roedores. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 91, 16–24, 2010.

Ceribasi, A.O., Turk, G., Sonmez, M., Sakin, F., Atessahin, A. Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology, testicular histology and blood oxidant/antioxidant balance, and protective roles of lycopene and ellagic acid. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. **V.107**, p.730-736, 2010.

Devipriya, N., Srinivasan, M., Sudheer, A.R., Menon, V.P. Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose dependent study. **Singapore Medical Journal**. v.48, p. 311–18, 2007.

Girish, C., Shweta, O., Raj, V., Balakrishnan, S., Varghese, R.G. Ellagic acid modulates sodium valproate induced reproductive toxicity in male Wistar rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.58, n.4, p. 416-422, 2014.

Luo, T., Miranda-Garcia, O., Adamson, A., Sasaki, G., Shay, N.F. Development of obesity is reduced in high-fat fed mice fed whole raspberries, raspberry juice concentrate, and a combination of the raspberry phytochemicals ellagic acid and raspberry ketone. **Journal of Berry Research**. V.6, p,213-223,2016.

OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD 421. Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. Organisation for Economic Cooperation and Development, 2015.

Robb, G. W.; Amann, R. P.; Killian, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 1, p. 103-107, 1978.

Sellers, R. S. et al. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v.35, p.751-755, 2007.

Turk, G., Atessahin. A., Sonmez, M., Ceribasi, A.O, Yuce, A. Improvement of cisplatininduced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. **Fertil Steril**, v.89, p.1474-1481, 2008.

Turk, G., Sonmez, M., Ceribasi, A.O., Vuçe, A., Atessahin, A. Attenuation of cyclosporine a-induced testicular and spermatozoa damage associated with oxidative stress by ellagic acid. **International Immunopharmacology**. V.10, p. 177–182,2010.

Turk, G., CeribasI, A.O., Sahna, E., Atessahin, A. Lycopene and ellagic acid prevent testicular apoptosis induced by cisplatin. **Phytomedicine**, v. 18, p. 356-361, 2011.

Verotta, L.,Panzella, L., Antenucci, S., Calvenzani, V., Tomay, F., Petroni, K., Caneva, E., Napolitano, A. Fermented pomegranate wastes as sustainable source of ellagic acid: antioxidant properties, anti-inflammatory action, and controlled release under simulated digestion conditions. **Food Chemistry**. v. 246, p.129-136,2017.

Yoshimura, y., Nishi, S., Zaima,N.,Moriyama, T., Kawamura, Y. Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic in obese, diabetic KK-A<sup>y</sup> mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.434, n.3, p.486-491, 2013.

Zhao, M., Tang, S. N., Marsh, J. L., Shankar, S., & Srivastava, R. K. Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb c nude mice. **Cancer Letters**, v. 337, p. 210–217, 2013.

## **CAPITULO II - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE O SISTEMA**

### **REPRODUTOR E OUTROS SISTEMAS ORGÂNICOS DE RATAS WISTAR**

Jamilly Érica Sousa Campelo<sup>1,2</sup>, Emanuelle Karine Frota Batista<sup>1</sup>, Daniela Kunkel<sup>1</sup>,

Raphael Briseno Frota<sup>1</sup>, Emanuela Ribeiro Moura<sup>1</sup>, Silvéria Regina Lira<sup>1</sup>, Amilton

---

<sup>2</sup> Autor correspondente: Jamilly Érica Sousa Campelo, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Campus Socopo-CCA, Teresina, PI, Brasil. CEP 64049-550. Endereço de e-mail: [jamilly\\_erica@hotmail.com](mailto:jamilly_erica@hotmail.com)

Paulo Raposo Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Campus Socopo-CCA, Teresina, PI, Brasil. CEP 64049-550. \*Autor para correspondência: [jamilly\\_ericahotmail.com](mailto:jamilly_ericahotmail.com)

## RESUMO

O ácido elágico possui diversas atividades biológicas como antioxidante e anticarcinogênica e está presente algumas frutas e nas nozes. O objetivo deste estudo foi investigar os possíveis efeitos tóxicos do ácido elágico (AE), pela administração oral, sobre o sistema reprodutor e outros sistemas orgânicos de ratas. Foram utilizadas 32 ratas Wistar divididas em 4 grupos, de acordo com as doses do AE: grupo controle (GC), água destilada e os grupos tratamentos de 3, 10 e 30 mg/kg do AE, nos quais se realizaram as seguintes avaliações: ciclo estral, toxicidade gestacional, morfologia e peso ninhada, peso dos órgãos, consumo de água e ração, massa corpórea, alterações comportamentais. Os dados foram avaliados por análise de variância seguida do teste seguida pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ), utilizando o *software*

GraphPad Prism® 5.03. Os resultados demonstraram que houve diminuição do consumo de água e ração na dose de 10 mg/kg, sem alterar o ganho de peso. Não houve alteração na massa relativa dos órgãos dos animais tratados quando comparados ao GC e não foram observados sinais de toxicidade na análise histopatológica dos órgãos. Não houve diferença significativa nas variáveis: ciclo estral, toxicidade gestacional, porém os filhotes apresentaram um aumento no ganho de peso no grupo de 3 mg/kg no dia 4 quando comparado ao GC. Conclui-se, por meio dos estudos de toxicidade reprodutiva e sistêmica, que o ácido elágico não produz alterações importantes, dentro do intervalo de doses e no período de tempo utilizado, em ratas Wistar.

Palavras-chaves: ovário; toxicidade reprodutiva; gestação.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to investigate the possible toxic effects of ellagic acid (AE), by oral administration, on the reproductive system and other organ systems of rats. Thirty-Two Wistar rats were divided into four groups according to the AE: control group (CG), distilled water and the 3, 10 and 30 mg / kg EA groups, in which the following evaluations were performed: estrus, gestational cycle, morphology and litter weight, organ weight, water and feed intake, body mass, behavioral changes. The data were evaluated by analysis of variance followed by the SNK test ( $p < 0.05$ ) using GraphPad Prism® software 5.03. The results showed that there was a decrease in water and feed intake at a dose of 10 mg / kg, without altering the weight gain. There

was also no change in the relative mass of treated animals when compared to CG. The histopathological analysis of the evaluated organs and the animals showed no behavioral signs of toxicity. There was no significant difference in the variables: estrous cycle, gestational toxicity. The pups showed an increase in weight gain in the 3 mg / kg group on day 4 when compared to the CG. It is concluded from studies of reproductive and systemic toxicity that ellagic acid does not produce significant changes, within the dose range and in the time, period used, in Wistar rats.

Keywords: ovary; reproductive toxicity; gestation.

## **INTRODUÇÃO**

O ácido elágico (AE) é um polifenol natural que se encontra em diversas frutas, legumes e extratos de plantas nas formas de taninos hidrolisáveis denominados elagitaninos, como framboesas, morangos, uvas, romã, groselha preta, camu-camu, nozes, amêndoas. Esse ácido passou a receber grande atenção devido à sua ampla gama de propriedades biológicas, tais como antioxidante, eliminação de radicais livres, quimiopreventivo e ações antiapoptóticas (Landete, 2011).

Devido a ideia de que o natural não faz mal, não se tem limites de uso dos fitoterápicos, não fornecendo informações sobre efeitos colaterais, representando cada vez mais um risco para a saúde humana. Estudos multidisciplinares, associando

fitoquímicos e farmacólogo, tornam-se cada vez mais importantes para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais (Maciel, et al., 2002).

Estudo revelaram que o AE foi investigado extensivamente por causa de sua ação antiproliferativa em alguns tipos de câncer, juntamente com seus efeitos antiinflamatórios. Um crescente número de evidências sugere que a ingestão de AE é efetiva na atenuação da obesidade e na melhora das complicações metabólicas mediadas pela mesma (Kang, et al., 2016).

Devido à escassez de pesquisas envolvidas na área da reprodução, principalmente envolvendo fêmeas, associado as suas grandes propriedades e o seu potencial, está se tornando um suplemento dietético cada vez mais popular nos últimos anos e o seu estudo se faz necessário para melhor entender a sua atuação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Substância Química**

Ácido elágico foi adquirido pela ActivePharmaceutica, tendo como o país de origem a China, com teor do ácido elágico foi de 92,1% identificado pelo processo de separação de compostos químicos em solução, através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### **Animais**

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) fêmeas e machos virgens (90 ± 8 dias de vida, 180-200 g), obtidos no Biotério Central da UFPI (CCA) mantidos em gaiolas-padrão de polipropileno de 49x31x21cm, com 3 a 4 animais/gaiola, forradas com cama de xilana, trocadas duas vezes por semana, e com água



potável e ração *ad libitum*. Os animais foram mantidos na sala de experimentação do mesmo Biotério, em ambiente climatizado 22 ° C ( $\pm 3$  °), a umidade relativa de 50-60%, com ciclo claro-escuro de 12 h e com sistema de exaustão com 15 a 20 trocas de ar/h controlando a dispersão de amônia no ambiente. Os protocolos experimentais foram estabelecidos de acordo com as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI antes de sua execução, aprovado e registrado com o parecer nº 263/16.

### **Efeito reprodutivo e sistêmico do ácido elágico sobre as fêmeas: ciclo estral, gestação, ninhada e toxicidade sistêmica**

#### **Desenho experimental farmacológico**

Foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*, linhagem Wistar), sendo 32 fêmeas e 16 adultos (180-200g), as fêmeas foram tratadas ao longo do estudo e os machos utilizados apenas para cobertura. Os animais foram separados aleatoriamente na proporção de duas fêmeas para um macho por gaiola e distribuídos em 4 grupos (n=8) sendo o grupo controle tratado com água destilada e três grupos tratados nas doses 3, 10 e 30mg/kg do ácido elágico, durante 63 dias seguidos sendo 14 dias de préacasalamento, 14 dias de acasalamento, 22 dias de gestação e 13 dias lactação (OECD 421, 2015). A aplicação das substâncias foi feita por gavagem, utilizando-se

agulha ponta-bola própria para ratos. As doses utilizadas foram baseadas em estudos já realizados com ácido elágico em machos (Beserra,2010).

### **Avaliação do Ciclo Estral**

Para avaliação do ciclo estral esfregaços vaginais foram realizados diariamente durante um período de 14 dias antes do início do tratamento, por meio da lavagem vaginal com solução salina a 0,9%, com introdução de 50 microlitros e imediata recuperação, deposição em lâmina de microscopia e exame imediato a fresco por meio de microscopia de luz, nas objetivas de 10 e 40x para constatação da fase do ciclo. Os resultados individuais foram registrados e a duração de cada fase foi calculada. Apenas os animais que exibiram ciclos regulares de 4 a 5 dias continuaram no estudo, onde foram distribuídas ao acaso em 4 grupos (n=8) sendo o grupo controle tratado com água destilada e três grupos tratados nas doses 3,10 e 30mg/kg do ácido elágico.

### **Toxicidade gestacional**

Para o procedimento de acasalamento as fêmeas foram mantidas com machos adultos, na proporção de um macho para duas fêmeas por gaiola. O esfregaço vaginal continuou a ser realizado diariamente durante o período de acasalamento, até o aparecimento de sêmen no lavado vaginal ou de tampão vaginal. O dia do aparecimento desses sinais confirmou a cópula e foi considerado primeiro dia da gestação (D1). Uma vez confirmada a prenhez, as ratas foram alojadas em gaiolas individualmente e o tratamento foi continuado até os 13 dias após o parto. A duração da gestação foi registrada e calculada a partir do dia primeiro dia da gestação (D1) ao

parto. O índice de fecundação foi avaliado pelo tempo (em dias) em que as fêmeas ficaram com os machos acasalando até a confirmação da gestação.

### **Avaliação da Ninhada**

Os recém-nascidos de cada ninhada foram examinados após o parto para o estabelecimento do número, comprimento corporal (da extremidade da face até a extremidade da cauda) e o sexo de filhotes. Foram registrados também quanto à presença de filhotes nascidos mortos, nascidos vivos e de anormalidades macroscópicas. Os recém-nascidos foram pesados no primeiro, quarto e 13º dia após o nascimento, sendo que nesses momentos foi registrado qualquer comportamento anormal.

A distância ano-genital (DAG) de cada filhote foi medida no mesmo dia pós-natal, em pelo menos uma ocasião. No dia 13 pós-nascimento os filhotes foram eutanasiados por inalação de isoflurano, cuidadosamente examinados quanto à presença de anormalidades macroscópicas, com especial atenção aos genitais externos que foram examinados quanto a sinais de desenvolvimento alterado.

### **Pesagem e coleta dos órgãos**

Ao final dos 63 dias (64º dia, D64), foi feito esfregaço vaginal para determinar a fase do ciclo estral e permitir correlação com a histopatologia dos órgãos reprodutores (OECD, 2015). As ratas foram então eutanasiadas por sobredose de anestésico (Tiopental sódico 150mg/kg e Lidocaína 10mg/kg, via IP) para coleta e avaliação dos órgãos internos. Em seguida foram submetidas a uma necropsia completa para avaliação dos órgãos do sistema reprodutor. O número de locais de implantação foi registrado.

Foram realizadas pesagem de coração, pulmão, baço, fígado, rins, adrenais, ovários e útero. Os segmentos destes órgãos foram fixados em formol tamponado (solução de formol a 10% tamponado) e após 24 horas resseccionados para processamento histopatológico no qual foram desidratados com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanizadas em xilol, submetidas a impregnação e inclusão em parafina (Bacha; Wood, 1990). Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração com hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio de luz.

### **Toxicidade sistêmica**

Concomitantemente ao tratamento, os mesmos animais foram avaliados, quanto à toxicidade sistêmica do ácido elágico segundo os parâmetros: consumo de água e ração, massa corpórea, alterações comportamentais, avaliação macroscópica e microscópica dos órgãos.

### **Consumo de água e ração**

O consumo de água (mL) e ração (g) dos animais tratados foi aferido por gaiola individual duas vezes por semana após o início do tratamento, durante os 63 dias. Foi oferecido a cada gaiola 400g ração e 700mL de água e, no momento da reposição, e foram reavaliadas as quantidades restantes de água e ração. O consumo de cada animal foi avaliado a partir da diferença entre a quantidade oferecida e o restante registrado.

### **Massa corpórea**

O parâmetro massa corpórea (g) dos animais tratados foi aferido início e no final do período de 63 dias do tratamento (dias 1 e 63).

### **Alterações comportamentais**

Durante o período de administração, os animais foram observados todos os dias quanto a sinais de toxicidade. Foram avaliadas as seguintes alterações comportamentais: piloereção, perda de pelos, tremores, salivação, convulsões, hipoatividade, redução do consumo normal de ração e presença de diarreia e outros comportamentos estranhos, como automutilação e andar para trás.

### **Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Student Newman-Keuls* (SNK) ( $p < 0,05$ ), utilizando o software GraphPad Prism® 5.03.

## **RESULTADOS**

### **Toxicidade Reprodutiva**

Não houve diferença significativa na duração (em dias) das fases do ciclo estral das fêmeas tratadas com ácido elágico nas doses 3,10 e 30 mg/kg quando comparadas ao grupo controle (Tabela1).

**Tabela 1:** Avaliação da duração das fases do ciclo estral de ratas Wistar tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do ácido elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante 14 dias.

Grupo	Dose mg/Kg	Estro	Metaestro	Diestro	Proestro
Controle	H <sub>2</sub> O	2,25±0,36	3,87±0,79	3,87±0,69	2,00±0,53
	3	2,37±0,56	4,75±0,70	3,12±0,55	1,62±0,42
Ácido elágico	10	2,85±0,23	4,12±0,64	3,25±0,59	1,75±0,31
	30	2,00±0,38	5,62±0,32	3,12±0,35	1,25±0,31

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o controle.

Não houve diferença significativa na avaliação de fecundidade e no número de implantações entre os grupos de ratas tratadas com o ácido elágico quando comparado ao grupo controle (Tabela 2).

**Tabela 2:** Avaliação da toxicidade gestacional através da avaliação de fecundidade e do número de implantações das ratas tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do ácido elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante 14 dias de acasalamento.

Grupo	Dose mg/Kg	Avaliação de fecundidade (dias)	Número de implantações
Controle	H <sub>2</sub> O	5,37±2,19	11,75±0,41
	3	8,12±3,69	10,75±0,65
Ácido elágico	10	3,75±1,03	11,43±0,20
	30	5,75±2,77	11,50±0,57

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. Não houve diferença

estatisticamente significante entre os tratamentos.

Os resultados do efeito do AE sobre o comprimento dos filhotes e distância anogenital não tiveram diferença significativa entre os grupos tratados quando comparado ao grupo controle. A evolução ponderal de todos os grupos foi avaliada nos dias 1, 4 e 13, verificando-se aumento significativo no dia 4 entre o grupo de 3 mg/kg e o grupo controle (Tabela 3), que passou a ser insignificante no dia 13.

**Tabela 3:** Avaliação dos filhotes das ratas tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do ácido elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante a gestação e por 13 dias de lactação.

Grupo	Dose	Comprimento (cm)	Distância anogenital (mm)		Peso corporal			Ganho de peso (g)
			Dia 1	Dia 4	Dia 13			
Controle	H <sub>2</sub> O	6,17±0,05	2,63±0,12	6,14±0,08	8,70±0,12	20,07±0,41	13,93	
	3	6,01±0,04	2,38±0,13	6,21±0,08	9,36±0,17*	20,74±0,19	14,53	
Ácido elágico	10	6,37±0,04	2,72±0,12	6,24±0,08	8,51±0,10	19,94±0,27	13,70	
	30	6,14±0,03	2,48±0,12	6,18±0,06	8,54±0,11	19,89±0,21	13,71	

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. \* – quando difere do grupo controle.

### Toxicidade sistêmica

### Massa relativa dos órgãos

Na presente pesquisa não houve diferença significativa em relação ao peso relativo do fígado, rim, baço, útero, ovário, coração, pulmão e adrenais de ratas tratadas com ácido elágico nas doses de 3,10,30mg/kg quando comparado ao grupo controle (Tabela 4).

**TABELA 4** – Efeito da administração oral do ácido elágico sobre a massa relativa (g) [(massa do órgão em relação a massa corporal) X100] dos órgãos de ratas tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do ácido elágico (3, 10 e 30 mg/kg) durante 63 dias.

Órgão	Controle	Ácido elágico		
	H <sub>2</sub> O	3 mg/Kg	10 mg/Kg	30 mg/Kg
Fígado	5,08±0,33	4,95±0,18	5,33±0,26	5,05±0,17
Baço	0,35±0,05	0,35±0,09	0,28±0,02	0,28±0,01
Coração	0,39±0,008	0,38±0,02	0,39±0,01	0,39±0,02
Rins	0,76±0,04	0,74±0,02	0,83±0,05	0,79±0,03
Pulmão	0,67±0,03	0,69±0,03	0,74±0,04	0,66±0,02
Adrenais	0,03±0,002	0,04±0,01	0,08±0,05	0,03±0,003
Ovários	0,06±0,01	0,08±0,02	0,05±0,004	0,11±0,04
Útero	0,13±0,01	0,17±0,08	0,14±0,02	0,13±0,02

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

### Consumo de ração e água e massa corpórea

Os resultados deste estudo demonstraram que houve uma diminuição significativa tanto no consumo de água como no consumo de ração no grupo de 10mg/kg quando comparado ao grupo controle, porém no desenvolvimento ponderal



e no ganho de peso não houve diferença significativa nos grupos tratamentos nas doses de 3,10,30mg/kg quando comparado ao grupo controle (Tabela 5).

**Tabela 5:** Consumo de ração e água, evolução ponderal e ganho de peso corporal de ratas tratadas com água destilada (controle) e diferentes doses do ácido elágico (3,10,30mg/kg) durante 63 dias.

Grupo	Dose	Consumo mg/Kg de ração	Consumo de água	Massa corporal		Ganho de peso (g)
				Dia 1	Dia 63	
Controle	H <sub>2</sub> O	166,6±7,64	214,7±17,51	175,9±2,13	229,1±6,30	53,2
	3	144,8±6,64	170,8±14,67	178,4±2,97	245,6±7,68	67,2
Ácido elágico	10	139,5±6,57	*152,5±12,93*	177,8±7,34	229,9±8,33	52,1
	30	154,7±6,53	194,5±15,09	179,2±4,16	237,9±5,30	58,7

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. \* – quando difere do grupo controle.

### Aspectos macroscópicos dos órgãos

A análise macroscópica do coração, pulmão, baço, fígado, rins, adrenais, útero e ovários não demonstrou alteração em sua cor e morfologia, fato que evidencia a incapacidade da substância em produzir alterações estruturais, perceptíveis visualmente, nesses órgãos.

### Análise histopatológica

No exame histopatológico, tanto os animais tratados com água destilada quanto com ácido elágico (3, 10 e 30 mg/kg) apresentaram edema pulmonar e hemorragia leve, além de diminuição do espaço alveolar, vacuolização dos hepatócitos leve e

degeneração e necrose tubular leve. Nos demais órgãos (coração, adrenal, baço e os órgãos reprodutivos ovário e útero) não foram observadas alterações histológicas significativas nos animais que receberam AE.

## **DISCUSSÃO**

O ácido elágico possui várias propriedades farmacológicas importantes, entre elas agente protetor contra os efeitos de drogas anticancerígenas (Turk et al., 2008; Turk et al. 2010), efeito protetor contra a ação de droga anticonvulsivante (Ceribasi, et al. 2010), efeito anticancerígeno (Zaazaa et al., 2018) no tecido hepático e efeito antiviral contra HIV-1 (Promsong et al., 2018). Com isso é de fundamental importância verificar-se alguma toxicidade, especialmente sobre o sistema reprodutor feminino, sobre o qual não se tem registro de pesquisa para um uso seguro em fêmeas, especialmente as gestantes.

Não foram encontrados registros de estudos sobre toxicidade reprodutiva em fêmeas com o uso do ácido elágico, com isso neste estudo foram utilizadas diferentes doses para observar possíveis efeitos tóxicos sobre parâmetros reprodutivos e sistêmicos em ratas Wistar, prenhas e não prenhas.

Neste experimento, não houve diferença significativa na duração (em dias) das fases do ciclo estral das fêmeas tratadas com ácido elágico nas doses 3,10 e 30 mg/kg quando comparadas ao grupo controle (Tabela1). Assim, o AE mostra-se seguro para uso medicinal, nas doses e intervalo pesquisados.

Como medicamentos naturais não são regulados no mesmo grau que os produtos farmacêuticos tradicionais, é importante monitorar seu uso, particularmente na gestação, um momento potencialmente vulnerável para a mãe e o feto (Louik et al.,

2010). Neste estudo, avaliou-se o índice de fecundidade e à toxicidade gestacional, não houve diferença significativa no índice de fecundidade e no número de implantações entre os grupos de ratas tratadas com o ácido elágico quando comparado ao grupo controle (Tabela 2). Os resultados do efeito do AE sobre o comprimento dos filhotes e distância anogenital não tiveram diferença significativa entre os grupos tratados quando comparado ao grupo controle. A evolução ponderal de todos os grupos foi avaliada nos dias 1, 4 e 13, verificando-se aumento significativo no dia 4 entre o grupo de 3 mg/kg e o grupo controle (Tabela 3), que passou a ser tornou insignificante no dia 13.

Um requisito importante em experiências toxicológicas é a capacidade de avaliar os efeitos dos xenobióticos em órgãos. Para muitos órgãos, isso é feito por meio de exames macroscópicos, medição do peso e exame histopatológico do tecido. Peso do órgão pode ser o indicador mais sensível de um efeito de uma substância, embora possa ocorrer alteração de peso sem alterações patológicas, mas a ausência de alterações nos parâmetros fisiológicos avaliados enfatiza a baixa toxicidade do ácido elágico nas doses testadas (Bailey et al.,2004). Na presente pesquisa não houve diferença significativa em relação ao peso relativo dos órgãos fígado, rim, baço, útero, ovário, coração, pulmão e adrenais de ratas tratadas com ácido elágico quando comparado ao grupo controle (Tabela 4). Isso mostra a ausência de toxicidade sobre esses órgãos e sinaliza para a segurança no uso dessa substância como medicamento.

Para avaliação e diagnóstico da toxicidade sistêmica deve-se levar em consideração a massa corporal dos animais, do desenvolvimento ponderal, do consumo de água e ração, pelo aparecimento de alterações comportamentais e

físicas, como apatia, movimentos estereotipados, prostração, pelos arrepiados, diminuição da massa corporal além de alterações na massa relativa dos órgãos (Silva, 2010). Neste estudo, os resultados deste estudo demonstraram que houve uma diminuição significativa tanto no consumo de água como no consumo de ração no grupo de 10mg/kg quando comparado ao grupo controle, porém no desenvolvimento ponderal e no ganho de peso não houve diferença significativa nos grupos tratamentos nas doses de 3,10,30mg/kg quando comparado ao grupo controle (Tabela 5). A diminuição no consumo de ração e água no grupo de 10 mg/kg, pode ser explicada devido o ácido elágico ser um tanino hidrolisável da classe de compostos fenólicos, que se tornam responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glicoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (Mello,2001), fator esse que justifica a diminuição da ingestão de ração e água consumida pelos animais. No entanto, como os animais não tiveram redução significativa no desenvolvimento ponderal, nem no ganho de peso, pode-se deduzir que essa redução tenha ocorrido em uma fase e sido compensada em outra. Também não foi observado nenhum comportamento estranho, nem alterações motoras ou de equilíbrio, de modo semelhante, Patel et al. (2008) demonstraram que a administração do extrato da casca de romã em níveis de até 600 mg/ kg/ dia a ratos, durante 90 dias, não provocou nenhum efeito adverso na clínica, nos parâmetros comportamentais e nos pesos corporais.

A análise macroscópica do coração, pulmão, baço, fígado, rins, adrenais, útero e ovários não demonstrou alteração em sua cor e morfologia, fato que evidencia a incapacidade da substância em produzir alterações estruturais, perceptíveis visualmente, nesses órgãos. No exame histopatológico, tanto os animais tratados com água destilada quanto com ácido elágico (3, 10 e 30 mg/kg) apresentaram edema

pulmonar e hemorragia leve, além de diminuição do espaço alveolar, vacuolização dos hepatócitos leve e degeneração e necrose tubular leve. Nos demais órgãos (coração, adrenal, baço e os órgãos reprodutivos ovário e útero) não foram observadas alterações histológicas significativas nos animais que receberam AE. A literatura não registra efeitos tóxicos do ácido elágico sobre esses órgãos e, ao contrário, um estudo realizado com ácido elágico demonstrou um efeito preventivo contra a lesão crônica hepática induzida por álcool em ratos, confirmando o efeito positivo que o ácido elágico exerce (Devipriya et al., 2007) e efeitos protetores contra a toxicidade reprodutiva induzida por diversos fármacos anticancerígenos tais como a cisplatina e ciclofosfamida (Turk et al., 2010). Tasaki et al (2008), em pesquisa realizada com ácido elágico, demonstraram em seus dados histopatológico, que lesões foram observadas esporadicamente nos pulmões, coração, fígado e rins em machos e / ou fêmeas. No entanto são lesões bem conhecidas e ocorreram espontaneamente em ratos da linhagem estudada e também foram encontradas em no grupo controle. Outro estudo também observou edema pulmonar multifocal com infiltrado linfocitário peribronquiolar em pulmões de ratos Wistar, tratados e não tratados com AE, atribuídas pelos autores às condições inadequadas do ar inspirado pelos animais (Beserra et al., 2010). Desse modo as lesões pulmonares, encontrada neste estudo, uma vez que aparecem também no grupo controle, não podem ser atribuídas ao ácido elágico.

Conclui-se que por meio dos estudos de toxicidade reprodutiva e sistêmica em ratas Wistar, que o AE não causa alterações importantes dentro do intervalo de doses e no período de tempo utilizado, no entanto estudos adicionais se fazem necessários para elucidar alterações observadas no consumo de ração e água.

## **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa.

## REFERÊNCIAS

Bacha, W. J.; Wood. **Color atlas of veterinary histology**. Lea and Febiger, Philadelphia. p.269,1990.

Bailey S.A., Zidell, R.H., Perry, R.W. Relationships Between Organ Weight and Body/Brain Weight in the Rat: What Is the Best Analytical Endpoint? **Toxicologic Pathology**, v. 32, N. 4, 2004.

Beserra, A.M.S.S., Souza, M.C., Colodel, E.M., da Silva Jr., I. F., Lima, J.C. S., Silva, R.M., Martins, D.T.O. Avaliação toxicológica do ácido elágico em roedores. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 91, 16–24, 2010.

Ceribasi, A.O., Turk, G., Sonmez, M., Sakin, F., Atessahin, A. Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology, testicular histology and blood oxidant/antioxidant balance, and protective roles of lycopene and ellagic acid. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.107, p.730-736, 2010.

Devipriya, N., Srinivasan, M., Sudheer, A.R., Menon, V.P. Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose-dependent study. **Singapore Medical Journal**, v. 48, n. 4, p. 311–318, 2007.

Kang, I., Buckner, T., Shay, N.F., Gu, L., Chung, S. Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms. **Advances in Nutrition**, v.15, p.961-972, 2016.

Landete, J.M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v.44, p.1150-1160, 2011.

Louik, C., Gardiner, P., Kelley, K., Mitchell, A.A. Use of herbal treatments in pregnancy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, p. 202:443,2010.

Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr, V. F., Martins, J. R., Grynberg, N.F., Echevarria, A., Lapa, A. J., Vanderlinde, F. A. Croton cajucara as an alternative to traditional medicine in a modern health system. **Phytochem Pharmacol II Ser. Recent Prog. Med. Plants**, v. 8, p.502-17, 2002.

Mello, J.P.C., Santos, S.C., Taninos In: Simões, C.M.O, Schenckel, E.P., (orgs) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. UFSC: Porto Alegre, 2001.

OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD 421. Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. Organisation for Economic Cooperation and Development, 2015.

Patel, C., Dadhaniva, P., Hingorani, L., Soni, M.G. Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.8, p.2728-2735, 2008.

Promsong, A., Chuenchitra, T., Saipin. K., Tewtrakul, S., Panichayupakaranant, P., Satthakarn, S., Nittayananta, W. Ellagic acid inhibits HIV-1 infection *in vitro*: Potential role as a novel microbicide. **Oral Diseases**, v.4, p. 249-252, 2018.

Silva, V. C. L. da. **Avaliação da toxicidade reprodutiva de ratas wistar submetidas à ingestão do extrato etanólico das folhas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss).** 2010. 50 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2010.

Tasaki, M., Umemura, T., Maeda, M., Ishii, Y., Okamura, T., Inoue, T., Kuroiwa, Y., Hirose, M., Nishikawa, A. Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a subchronic toxicity study using F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.1119-1124, 2008.

Turk, G., Atessahin. A., Sonmez, M., Ceribasi, A.O, Yuce, A. Improvement of cisplatininduced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. **Fertil Steril**, v.89, p.1474-1481, 2008.

Turk, G., Sonmez, M., Ceribasi, A.O., Yuce, A., Atessahin, A. Attenuation of cyclosporine a-induced testicular and spermatozoa damage associated with oxidative stress by ellagic acid. **International Immunopharmacology**. V.10, p. 177–182,2010.

Zaazaa, M.A., Lokman, S.M., Shalby, B.A., Ahmed, H.H., El-Toumy, A.S. Ellagic acid holds promise against hepatocellular carcinoma in an experimental model: Mechanisms of Action. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.19, p. 387393, 2018.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ácido elágico tem amplas perspectivas de uso, com base nas pesquisas já realizadas, como antioxidante. Neste estudo foi identificada leve toxicidade reprodutiva no macho, com redução da concentração espermática e toxicidade sistêmica na fêmea, com redução do consumo de ração e água. No entanto foram alterações leves, que provavelmente não chegam a comprometer o uso medicinal da substância. Por isso, há necessidade de realizar novos estudos mais prolongados e com a separação dos protocolos visando o efeito crônico da substância.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS**



ABRAMS, S.A. In útero physiology role in nutrient delivery and fetal development for calcium, phosphorus, and vitamin d 1-4. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, suppl. 2, p. 604-607, 2007.

AHMAD I, AKTHAR KM, HUSSAIN T. 2008. Arsenic induced microscopic changes in rat testis. **Professional Med J**, v.15, p. 287-91.

AIRES, A.; CARVALHO, R.; SAAVEDRA, M.J. Valorization of solid wastes from chestnut industry processing: Extraction and optimization of polyphenols, tannins and ellagitannins and its potential for adhesives, cosmetic and pharmaceutical industry. **Waste Management**, v.48, p. 457-464, 2016.

ALMEIDA, L.M. **Quantificação histológica da espermatogênese de ratos wistar tratados com dimetil sulfóxido (dmsO)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2013.

ASCACIO-VALDÉS, J. A., AGUILERA-CARBÓ, A., RODRÍGUEZ-HERRERA, R., & AGUILAR-GONZÁLEZ, C. Análisis de ácido elágico en algunas plantas del semidesierto mexicano. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**. v. 44(2), p. 36-40, 2013.

BACHA, W. J.; WOOD. **Color atlas of veterinary histology**. Lea and Febiger, Philadelphia. 269p.1990.

BACHEGA, T. A. et al. The environmental endocrine disruptors must receive the attention of Brazilian endocrinologists. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 2, p. 175-176, 2011.

BAILEY, S.A.; ZIDELL, R.H.; PERRY, R.W. Relationships Between Organ Weight and Body/ Brain Weight in the Rat: What Is this Best Analytical Endpoint?

**Toxicologic Pathology**, v. 32, n. 4, p.448-466, 2004.

BARBOSA, C.E.S. Avaliação da toxicidade oral aguda e da atividade antitumoral in vivo do látex e extratos de uma apocynaceae de uso popular. **Vita et Sanitas**, n.08, 2014.

BARBOSA, N.C. **Uma revisão bibliográfica dos fatores antinutricionais: taninos, inibidores de proteases e lectinas**. 2014. 87 f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Química) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás. Anápolis, 2014.

BARROS, L. A. **Avaliação da atividade e toxicidade reprodutiva do extrato hidroalcoólico das folhas *Azadiractha indica* em ratos Wistar machos e fêmeas**.2011. 90f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia com ênfase em Plantas Medicinais) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

BARRIL, N.; GRISOTTO, A.C.D.; COELHO, A. C. T. E. R.; PEREIRA, G.H.; GARCIA, J. C. Implantação da técnica de citologia vaginal para a identificação e monitorização das fases do ciclo estral em ratas wistar. **Revista Cuidarte**, v.10(2), p.162-164,2016.

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.

BESERRA, A.M.S.S., SOUZA, M.C.; COLODEL, E.M.; DA SILVA JR., I. F.; LIMA, J.C.S.; DA SILVA, R.M.; MARTINS, D.T.O. Avaliação toxicológica do ácido elágico em roedores. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 91, p. 16–24, 2010.

BROHI, R.D.; WANG, L.; TALPUR, H.S.; WU, D.; KHAN, F.A.; BHATTARAI, D.; REHMAN, Z.U.; FARMANULLAH, F.; HUO, L.J. Toxicity of nanoparticles on the reproductive system in animal models: A review. **Frontiers in Pharmacology**, v.8, p.606, 2017.

CALLEGARI, F. V.R. **Perfil da secreção de progesterona em ratas no proestro: uma nova proposta para o controle do pico pré-ovulatório de LH.**2008.87f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Ribeirão Preto, 2008.

CAMPBELL, M. A. GOLUB, M.S.; IYER, P, KAUFMAN, F.L.; LI, L.H.; MORAN MESSEN F.; MORGAN, J.E, DONALD, J.M. Reduced water intake: implications for rodents developmental and reproductive toxicity studies. **Birth Defects Research (Parte B)**, n. 86, p. 157-175, 2009.

CARDOSO, N.Q. **Desenvolvimento tecnológico de extratos vegetais padronizados a partir de *Lafoensia pacari* A. St. – Hill (Lythraceae).** 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

CERBARO, D.; ROMBALDI, C.V.; SAINZ, R.L.; NOBRE, G.A. Influência da adição de taninos elágicos na qualidade de vinhos merlot da região da Campanha. **Journal of bioenergy and food science**, v.3, n.3, p.149-160, 2016.

CHEN, S.C.; CHUNG, K.T. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. **Food Chemical Toxicology**, v. 38, n.1, p. 1-5, 2000.

CORNWALL G.A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v.15, p. 213-27,2009.

COSTA, D.S.; DE PAULA, T.A.R. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia Vila Velha**, v. 4, p. 53-72, 2003.

COSTA, E. M. et al. Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 2, p. 153-61, 2014.

COSTA, F.M.; CAMPOS, J.C.; FONSECA, F.V.; BILA, D.M. Tratamento de lixiviados de aterros de resíduos sólidos utilizando Processos Fenton e Foto-Fenton Solar. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 1, 2015.

DEZOTTI, M.; BILA, D.M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. **Química Nova**, v.30, n.3, p. 651-666, 2007.

ESKELUND, A.; BUDAC, D.P.; SANCHEZ, C. ELFVING, B.; WEGENER, G. Female flinders sensitive line rats show estrous cycle-independent depression-like behavior and altered tryptophan metabolism. **The Journal of Neuroscience**, v. 329, p. 337–348, 2016.

ESHKOLI, T.; SHEINER, E.; BEN-ZVI, Z.; HOLCBERG, G. Drug transport across the placenta. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.12, p. 707-714, 2011.

ESPÍN, J. C.; LARROSA, M.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMAS- BARBERAN, F. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: the evidence so far. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 15, 2013.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando allium cepa e oreochromis niloticus como sistemas-testes**.2005. 211f.Dissertação(Mestrado em Ciências Biológicas) – programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro,2005.

FLORIO; J.C; SOUSA, A.B.S. Farmacocinética. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIACK, S.L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, Cap 4: p.29-48, 2006.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ- GARCIA, F. (Ed.). **Male reproduction. A multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Livingstone, p.197-219, 1998.

GEHLEN, G. **Efeito dos hormônios gonadais sobre os filamentos intermediários de artrócitos hipocampais durante o desenvolvimento e ciclo estral: uma abordagem imunoistoquímica**. 2009. 142 f. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

GONÇALVES, A.E.S.S. **Compostos bioativos do camu camu (*myrciariadubiamcvaugh*): caracterização e atividade biológica**. 2012. 114f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GRAY, L.E.; OTSBI, J.; KELCE, W, R. Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**.v.45, n.4, p. 425-437, 2004.

HERMO, L.; PELLETIER, R.M.; CYR, D.G.; SMITH, C.E. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. **Microscopy Research and Technique** , v.73, p. 241–278, 2010.

HOLLENBACH, C.B.; BORTOLINI, C.E.; BATISTA, J.M.; HOLLENBACH, E.B.; SCHUCH, T.L.; PACHECO, M.H.; MELLO, F.B.; MELLO, J.R. “Neonatal development and teratogenic potential of Wistar rats offspring in the study of reproductive toxicity of two commercial phytotherapeutic preparations with soy *Glycine max* (L.) Merr.”. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 62, n.

4, p. 845–852, 2010.

KANG, I., BUCKNER, T., SHAY, N.F., GU, L., CHUNG, S. Improvements in metabolic health with consumption of ellagic acid and subsequent conversion into urolithins: evidence and mechanisms<sup>1,2</sup>. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 7, n.5, p. 961–972, 2016.

LIMA, G. D. A. **Fertilidade e morfofisiologia epididimária de ratos wistar submetidos a ingestão de arsenato e arsenito de sódio**. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2013.

LOURENÇO, A.C.S.; MIGUEL, L.K.; GUARIDO, K.L.; SENSIATE, L.A.; SALLES, M.J.S. Óleo de Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em padrões reprodutivos de Camundongos e no desenvolvimento embriofetal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.11, n.4, p.407-413, 2009.

LOURENÇO, E.L.B. **Toxicologia reprodutiva do extrato hidroalcoólico liofilizado da *Tropaeolum majus* L. (Chaguinha)**. 2012. 108 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

LYRA, M.M.A. **Avaliação toxicológica reprodutiva do fitoterápico sanativo**. 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

MAKKAR, H.P.S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, v.49, p. 241-256, 2003.

MASHHADIZADEH, S., FARBOOD, Y., DIANAT, M., KHODADADI, A., SARKAKI, A. Therapeutic effects of ellagic acid on memory, hippocampus electrophysiology deficits, and elevated *tnf-α* level in brain due to experimental traumatic brain injury. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, n.4, p. 399–407, 2017.

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

MELO, N.J.A. **Potencial tóxico, citotóxico e mutagênico de extratos aquosos de *Licania rigida* (Chrysobalanaceae) em células in vivo**. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Curso de em Produção Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.

MONTEIRO, J.M.; ALBURQUEQUE, U. P.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química a ecologia. **Revista Química Nova**, v. 28, n.5, p.892-896, 2005.

MÜLLER, J.C. **TOXICIDADE REPRODUTIVA DA *Morinda citrifolia* Linn.** 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de PósGraduação em Farmacologia - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NASCIMENTO, L.S. **Efeito do extrato hidroalcoólico da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Martius) sobre a morfologia testicular de ratos adultos saudáveis e expostos ao cádmio**. 2017. 84f Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2017.

OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD 422. Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. Organisation for Economic Cooperation and Development, 2015.

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). Guideline for Testing of Chemicals. OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Guideline. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. 2001.

OECD's Guideline for the testing of chemicals – nº 407: “**Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents**” 1995.

OLIVA S. U.; RINALDO P. A & STUMPP T. Biologia epididimária: Maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, v. 33, p. 419-425,2009.

PANNOCCHIA, M.A.; BORELLA, M.I.; CAMARGO, A.C.M.; GILIO J.M.; SILVA, C.A. Estratégia efetiva de fixação do testículo de ratos Wistar para avaliar os parâmetros morfológicos e morfométricos do epitélio seminífero. **ConScient Saud**, v. 7, n.2, p. 227-233,2008.

PIRES JÚNIOR, H.; BORGES, L.; SOUSA, L.; CUNHA, L.; LINO JÚNIOR, R.; MELO, D.; *Pereira, M.E.* Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 512-519, 2012.

POZZATTI, P.N.; CASAGRANDE, F. P.; VALENTIM, T. P.; ZÉLIA TEREZINHA GAI; PORFÍRIO, L. C. Aspectos farmacológicos e terapêuticos da utilização da erva de santa maria (*chenopodium ambrosioides*) em humanos e animais. **PUBVET**, Londrina, v. 4, n. 35, ed. 140, Art. 946, 2010.

RINALDO, D. **Determinação de enantiômeros em extratos vegetais por cromatografia quiral e dicróismo circular**. 2010. 106 f. Tese (Doutorado em Química) Universidade Estadual Paulista, Araraquara,2010.

ROBAIRE, B.; VIGER R.S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. **Biology of Reproduction**, v. 52, n.2, p. 226-36,1995.

ROGOSIC, J.; ESTELL, R.E.; IVANKOVIC, S.; KEZIC, J.; RAZOV.J. Potential mechanisms to increase shrub take and performance of small ruminants in



mediterranean shrubby ecosystems. **Small Ruminant Research**, v.74, p. 1–15, 2008.

ROSS, E.J.; GRAHAM, D.L. MONEY, K.M.; STANWOOD, G.D.; Developmental consequences of fetal exposure to drugs: what we Know and what we still learn. **Neuropsychopharmacology Reviews**, v.40, p. 61-87, 2015.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. **Clearwater: Cache River Press**,1990.

SALES, P. A. B. **Toxicidade reprodutiva e sistêmica do extrato hidroalcoólico de vagens de *Samanea tubulosa* (Benth.) em ratas Wistar**. 2011. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal do Piauí, Teresina,2011.

SANDMAN, P. Óleo de Romã (Fonte Natural de Ácido Púrico e Ácido Elágico). **Via Farma**, São Paulo, ano1, n.1, 2013.

SANTOS, D. B. **Estudos dos efeitos do extrato etanólico das folhas da *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire sobre parâmetros reprodutivos e histopatológicos em ratas**. 2009. 45f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia com ênfase em Plantas Mediciniais) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

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

SANTOS, J.M.M. **Influência das variações hormonais no contato social de ratas com diferentes condições nociceptivas**.2017.66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Universidade Federal de Sergipe – São Cristovão, 2017.

SANTOS, L.D. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. em ratos wistar.** 2017.99f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 2017.

SEPÚVEDA, L.; ASCACIO, A.; HERRERA, R.R.; CARBÓ, A.A.; AGUIAR, C.N. Ellagic acid: biological properties and biotechnological development for production processes. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.22, p.4518-4523, 2011.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. F. Introdução à toxicologia dos alimentos. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ: Campus, **Elsevier**, 2014.

SOBRAL., F.R.S. **Proposta de guia para a realização de estudos não clínicos de segurança, necessários ao desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos.** 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Programa de Pós-Graduação do Instituto de Saúde Coletiva - Universidade Federal da Bahia, Brasília – Distrito Federal, 2006.

TAHMOURESPOUR, A.; TABATABAEE, N.; KHALKHALI, H.; AMINI, L.; Tannic acid degradation by Klebsiella strains isolated from goat faces. **Iranian Journal of Microbiology**, v.8(1), p. 14-20, 2016.

TASAKI, M.; UMEMURA, T.; MAEDA, M.; ISHII Y.; OKAMURA T.; INOUE T.; KUROIWA Y.; HIROSE M.; NISHIKAWA A. Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a subchronic toxicity study using f344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.46(3), p. 1119-24, 2008.

US EPA (Environmental Protection Agency). Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. EPA/630/R-96/009, Washington, 1996.

VILELA, M.G.; JÚNIOR, J.L.S.; CASTRO E SILVA, J.G.; Determination of estrous cycle in rats by vaginal lavage. **FEMINA**, v.35, n.10, 2007.

WOLFSEGGER, M. J.; JAKI, T.; DIETRICH, B.; KUNZLER, J. A.; BARKER, K. A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 240, n. 1, p.117-122, 2009.

WU, S.; TIAN L. Diverse Phytochemicals and Bioactivities in the Ancient Fruit and Modern Functional Food Pomegranate (*Punica granatum*). **Molecules**, v.22, 2017.

## ANEXO I - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**  
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
 Telefone (88) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



## CERTIFICADO

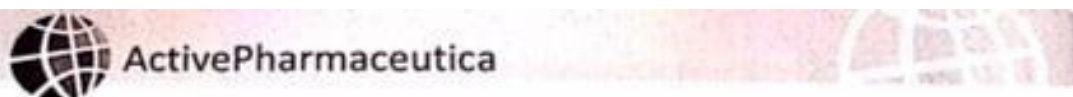
Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito do ácido elálgico sobre o sistema reprodutor de ratos wistar", registrada nº 263/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. AMILTON PAULO RAPOSO COSTA- Morfofisiologia Veterinária/CCA/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 09/12/2016.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Janeiro/ 2017 à Fevereiro/2018
Espécie/Linhagem/raça	Rato heterogênico/ wistar
Nº de Animais	128
Peso/ Idade	180-200g/ 90 ± 8
Sexo	56 machos e 72 fêmeas
Origem	Biotério Geral da UFPI- Centro de Ciências Agrárias.

Teresina, 09 de Dezembro de 2016.

  
 Prof.ª Ivetel L. de Mendonça  
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
 Coordenadora

## ANEXO II – Certificado de Análises do Ácido Elágico



CERTIFICADO DE ANÁLISES N°: 03/17

INSUMO: ÁCIDO ELÁGICO 90%

NOME BOTÂNICO: *Punica granatum*

LOTE FABRICANTE: EA161110

ORIGEM: China

FABRICAÇÃO: 10/11/2016

PARTE UTILIZADA: Cascas das Frutas

LOTE PRODUÇÃO: 0086/0217

CAS: 476-66-4

VALIDADE: 09/11/2018

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Descrição (Visual e organoléptica)	Pó fino cinza com odor característico	Conforme*
Identificação	HPLC	Conforme**
Teor de Ácido Elágico	≥90% (HPLC)	92,1%**
Densidade	-	0,570g/mL*
Solubilidade	-	Moderadamente solúvel em álcool; pouco solúvel em água*
Perda por dessecação	≤5,0%	2,11%**
Cinzas	≤3,0%	1,82%**
Metais pesados	≤20 ppm	Conforme**
Arsênio	≤2 ppm	Conforme
Chumbo	≤3 ppm	Conforme
Cádmio	≤1 ppm	Conforme
Mercúrio	≤0,1 ppm	Conforme
Solventes Residuais	Eur. Pharm.	Conforme**
Microbiológico		
Contagem Total	≤1000 ufc/g	Conforme**
Fungos e Leveduras	≤100 ufc/g	Conforme
<i>E. coli</i>	Negativo	Conforme
<i>Salmonella</i>	Negativo	Conforme
<b>Parecer:</b> Extrato vegetal conforme especificações.		

Referências: FABRICANTE

\*Resultado obtido quando realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Active Pharmaceutica.

\*\*Resultado transcrito conforme laudo original do fabricante.

**Armazenamento:** Conservar em recipientes bem fechados ao abrigo de luz, calor e umidade.

Responsável Técnica: Francielly Grassi – CRF/SC 3557

  
 Francielly Grassi  
 CRF/SC 3557

São José, 11 de janeiro de 2017

