

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO
CENTRO-OESTE
THAIS ARRUDA DE SANTANA BISS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PLANTAS MEDICINAIS NO DESEMPENHO
REPRODUTIVO E NO DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL

CAMPO GRANDE
2024

THAIS ARRUDA DE SANTANA BISS

**AVALIAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS NO DESEMPENHO REPRODUTIVO E
DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: A Biodiversidade do Pantanal e Cerrado e suas relações e aplicações na saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

CAMPO GRANDE

2024

THAIS ARRUDA DE SANTANA BISS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PLANTAS MEDICINAIS NO DESEMPENHO
REPRODUTIVO E DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: A Biodiversidade do Pantanal e Cerrado e suas relações e aplicações na saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

BANCA EXAMINADORA

NOTA/Conceito

Rodrigo Juliano Oliveira- Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS)

Leandro Antero da Silva- Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS)

Mariana de Oliveira Mauro- Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS)

Danielle Bogo – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS)

AVALIAÇÃO FINAL:

() Aprovado

() Reprovado

AGRADECIMENTO

A Deus, toda honra, glória e poder. Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Ao meu esposo, Ewerton de Souza Biss, por todo apoio, e por estar presente em minha vida e nessa caminhada.

Ao meu pai, Cícero Leandro de Santana e as minhas irmãs, Thaciana Arruda de Santana e Thanya Mara Arruda de Santana, por acreditarem em mim.

Aos meus professores da graduação, em especial, à professora Patrícia Soares Pacheco e ao professor Lucas Roberto Pessatto que me inspiraram a seguir essa caminhada.

Ao professor Rodrigo Juliano Oliveira, por ter me recebido, concedido essa oportunidade e compartilhado seus conhecimentos.

Ao professor Karuppusamy Arunachalam por suas contribuições aos experimentos.

Às minhas colegas do laboratório CeTroGen, Giovana Martins Dantas de Oliveira, Mariana dos Santos Zanelato, Maria Julia Costa e Silva Cordeiro das Neves, por toda ajuda.

SIGLAS

DNA- Ácido desoxirribonucleico

OMS- Organização Mundial da Saúde

PCR- Proteína C reativa

PIG- Pequenos para a idade gestacional

SDa- Seiva de *Dipteryx alata*

SUS- Sistema Único de Saúde

EEGv- Extrato etanolico de *Guettarda virbunoides*

E vós também, pondo nisto mesmo toda a diligência, acrescentai à vossa fé a virtude, e à virtude a ciência; e à ciência a temperança, e à temperança a paciência, e à paciência a piedade; e à piedade o amor fraternal, e ao amor fraternal a caridade.

² Pedro 1:5-7

À DEUS toda Honra, Glória e Poder.

RESUMO

As plantas são utilizadas a séculos como recurso natural para a sobrevivência humana, tanto como alimento ou fonte medicinal. *Dipteryx alata* é uma planta pertencente à família Fabaceae que é usada na medicina popular como anti-inflamatório, no auxílio do emagrecimento, como antiofídico, cicatrizante, antioxidante e para a redução do colesterol. *Guettarda viburnoides* é utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias. Não há na literatura estudos que evidenciem efeitos prolongados do uso dessas plantas por gestantes. Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dessas plantas medicinais no desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal. Para o estudo com a seiva de *D. alata*, camundongos Swiss foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupo experimentais (n=10): Grupo controle- os animais receberam o veículo (água destilada) na proporção de 0,1 mL/10 g de peso corpóreo (p.c.) por gavagem (via oral – v.o.) do 1º ao 18º dia de gestação (d.g.); Grupos seiva de *D. alata*(SDa) – os animais receberam seiva, em substituição à água, em diluições de 25% (SDa25), 50% (SDa50) e 75% (SDa75). Já para o estudo com o extrato etanólico de *G. viburnoides*, os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupo (n=10): Grupo controle- os animais receberam solução fisiológica na proporção de 0,1 mL/10 g (p.c.; v.o.) do 1º ao 18º d.g.; Grupo extrato etanólico de *G. viburnoides* (EEGv) os animais foram tratados com EEGv nas doses de 300 e 1000 mg/Kg (c.p.; v.o.) do 1º ao 18º d.g. Os resultados demonstraram que a SDa não alterou o desempenho reprodutivo. Porém, alterou o desenvolvimento embriofetal e a maior dose de SDa aumentou o peso fetal, o peso placentário, o índice placentário, a frequência de malformações externas e de escoliose (malformação esquelética). Além disso, reduziu a eficiência placentária. Já a menor dose aumentou a frequência global de malformação esquelética. Todas as doses reduziram a frequência de malformações viscerais. Frente ao exposto, considera-se que SDa não altera o desempenho reprodutivo de fêmeas, altera o desenvolvimento embriofetal e tem baixo potencial teratogênico. Os resultados do estudo com EEGv demonstraram que não houve alteração no desempenho reprodutivo e no desenvolvimento embriofetal. A avaliação individual e global da frequência de malformações externas não demonstrou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados. Na avaliação de malformação visceral observou-se que a maior dose do EEGv aumentou a frequência de hidrocefalia de grau leve e a frequência global de malformações viscerais para o mesmo grupo. A avaliação das malformações esqueléticas demonstrou que não houve diferença significativa na frequência de malformações na análise individual por alteração, no entanto na avaliação global observou-se aumento na frequência global de malformações esqueléticas no grupo tratado com a menor dose de EEGv. Diante disso considera-se que o EEGv não altera o desempenho reprodutivo, não altera o desenvolvimento embriofetal e possui baixo potencial teratogênico.

Descritores: teratogênese, malformações, plantas medicinais.

ABSTRACT

Plants have been used for centuries as a natural resource for human survival, both as food and as a medicinal source. *Dipteryx alata* is a plant belonging to the *Fabaceae* family that is used in folk medicine as an anti-inflammatory, to aid weight loss, as an antivenom, healing agent, antioxidant and to reduce cholesterol. *Guettarda viburnoides* is used to treat inflammatory diseases. There are no studies in the literature that demonstrate prolonged effects of the use of these plants by pregnant women. In view of the above, the objective of this study was to evaluate the effects of these medicinal plants on reproductive performance and embryofetal development. For the study with *D. alata* sap, Swiss mice were randomly distributed into 4 experimental groups (n=10): Control group - the animals received the vehicle (distilled water) in the proportion of 0.1 mL/10 g of body weight (bw) by gavage (oral route - v.o.) from the 1st to the 18th day of gestation (d.g.); *D. alata* sap groups (SDa) – the animals received sap, instead of water, in dilutions of 25% (SDa25), 50% (SDa50) and 75% (SDa75). For the study with the ethanolic extract of *G. viburnoides*, the mice were randomly distributed into 3 groups (n = 10): Control group – the animals received saline solution in the proportion of 0.1 mL/10 g (bw; v.o.) from the 1st to the 18th d.g.; *G. viburnoides* ethanolic extract group (EEGv) – the animals were treated with EEGv at doses of 300 and 1000 mg/kg (c.p.; v.o.) from the 1st to the 18th d.g. The results demonstrated that SDa did not alter reproductive performance. However, it altered embryofetal development and the highest dose of SDa increased fetal weight, placental weight, placental index, and the frequency of external malformations and scoliosis (skeletal malformation). In addition, it reduced placental efficiency. The lowest dose increased the overall frequency of skeletal malformation. All doses reduced the frequency of visceral malformations. In view of the above, it is considered that SDa does not alter the reproductive performance of females, alters embryofetal development and has low teratogenic potential. The results of the study with EEGv demonstrated that there was no change in reproductive performance and embryofetal development. The individual and global evaluation of the frequency of external malformations showed no significant difference between the control group and the treated groups. In the evaluation of visceral malformation, it was observed that the highest dose of EEGv increased the frequency of mild hydrocephalus and the overall frequency of visceral malformations for the same group. The evaluation of skeletal malformations showed that there was no significant difference in the frequency of malformations in the individual analysis by alteration, however, in the global evaluation, an increase in the global frequency of skeletal malformations was observed in the group treated with the lowest dose of EGv. Therefore, it is considered that EEGv does not alter reproductive performance, does not alter embryofetal development and has low teratogenic potential.

Descriptors: teratogenesis, malformations, medicinal plants

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Plantas Medicinais.....	3
2.2 <i>Dipteryx alata</i>	4
2.3 <i>Guettarda viburnoides</i>	6
2.4 Teratologia e malformações	9
3. OBJETIVO	11
3.1 Objetivo geral	11
3.2 Objetivos específicos.....	11
4. METODOLOGIA	12
4.1 Material vegetal e preparação do extrato da seiva bruta de <i>D. alata</i>	12
4.2 Material Vegetal e preparação do extrato etanólico de <i>G. viburnoides</i>	13
4.3 Animais Experimento <i>D. alata</i>	14
4.4 Animais Experimento <i>G. viburnoides</i>	15
4.5 Delineamento Experimental <i>D. alata</i>	15
4.6 Delineamento Experimental <i>G. viburnoides</i>	16
4.7 Ensaio Biológicos	Erro! Indicador não definido.
4.8 Parametros Biométricos	Erro! Indicador não definido.
4.9 Desenvolvimento Embrionário.....	15
5 Desempenho Reprodutivo	16
5.1 Ensaio do Micronúcleo e Sangue periférico	17
5.2 Fagocitose Esplênica	17
6. Análise Estatística	17
7. RESULTADOS, DISCUSSÃO	17
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	17
REFERÊNCIAS	18
ANEXO 1.....	26
ANEXO 2.....	53
ANEXO 3.....	83

1. INTRODUÇÃO

As plantas são mundialmente utilizadas na cultura popular como método terapêutico (Cunningham *et al.*, 2019). Com o uso comum das plantas para o tratamento de diversas doenças, existe a crença de que por serem produtos naturais, não trazem malefícios à saúde (Sen *et al.*, 2015). Entretanto, sabe-se que o conhecimento sobre o potencial toxicológico de diversas plantas ainda é limitado e existe o risco de reações adversas ao consumo extenso e variado dessas plantas. Tais reações estão condicionadas às características específicas do indivíduo, às características específicas das plantas, à contaminação e à falta de regulamentação do uso das plantas medicinais (Pedroso *et al.*, 2021).

A concentração de compostos e a combinação de diversos metabólitos nos extratos de plantas é o que determina o perfil de risco de cada planta. (Prinsloo; Nogemane; Street, 2018). Com isso, diversas plantas são associadas a efeitos nocivos, como toxicidade direta ou causada por interações erva-medicamento, contaminação ou adulteração com metais pesados (Kam; Barnett; Douglas, 2019). Estudos demonstram que as plantas medicinais são capazes de produzir reações indesejáveis e adversas, tais como carcinogenicidade, teratogenicidade, condições de risco de vida e até morte (Prinsloo; Nogemane; Street, 2018).

Embora existam plantas que causam efeitos nocivos à saúde, diversas plantas possuem potencial antioxidante (Thabit *et al.*, 2018) previnem doenças cardíacas (Mogharrabi *et al.*, 2020), possuem atividades hepatoprotetoras (Tehseen *et al.*, 2022), ação anti-inflamatória (Kumari *et al.*, 2022) e anticancerígena (Ren *et al.*, 2019).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a importância da medicina tradicional e o uso de plantas medicinais como método terapêutico e que esta é necessária na maioria dos países em desenvolvimento (OMS, 2020). De acordo com a OMS cerca de 80% da população desses países utilizam práticas tradicionais no tratamento de doenças (Saúde, 2006).

A biodiversidade da flora brasileira, abrange cerca de 25% de todas as espécies de plantas do mundo. Consequentemente, o Brasil é uma fonte potencial de plantas medicinais e algumas espécies de plantas brasileiras foram incluídas há décadas em diferentes Farmacopeias por fornecerem importantes substâncias utilizadas na prática médica mundial (Jamshidi-Kia, Lorigooini e Amini-Khoei, 2017; Souza *et al.*, 2021).

O gênero *Dipteryx*, pertence à família Fabaceae, reúne cerca de 13 espécies, dentre estas o *Dipteryx alata*. Essa planta é popularmente conhecida como baru ou cumbaru e é uma planta perene nativa do cerrado brasileiro. *D. alata* é conhecida por seu valor nutricional e seu uso medicinal. A planta pode ser consumida integralmente. Os frutos (castanha e polpa) podem ser consumidos *in natura*. A partir do fruto também é possível produzir óleos e outros produtos alimentícios. As folhas e cascas da planta são utilizadas como chás, macerados e cataplasma para o tratamento de doenças inflamatórias (Coco *et al.*, 2022), como cicatrizante (Coco *et al.*, 2022), antioxidante (Reis *et al.*, 2018), para redução do colesterol (Souza, de *et al.*, 2018) e para a perda de peso (Oliveira *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2023).

A família *Rubiaceae* é composta por 13.673 espécies distribuídas em 609 gêneros (Fonseca, 2019). Dentre os gêneros dessa família, *Guettarda* possui espécies que são encontradas em todo o planeta e em especial em zonas quentes e úmidas. *Guettarda virbunoides* é uma espécie encontrada nas regiões norte, nordeste, sudeste e centro-oeste do Brasil e é utilizada na medicina popular como planta medicinal. (Naressi *et al.*, 2015).

Apesar das descrições anteriores ainda são poucos os estudos a cerca dessas duas espécies que versem sobre o potencial farmacológico e segurança de uso dessas plantas. Tendo em vista que as regulamentações de prescrição, preparação e consumo das plantas não são claras e rigorosas, é necessário compreender o potencial tóxico-reprodutivos dessas plantas que são utilizadas para fins terapêuticos, na tentativa de garantir que estas sejam seguras ao uso (Farzaei *et al.*, 2020), em especial, para gestantes (Ishikawa *et al.*, 2018; Salustriano *et al.*, 2022; Nunes *et al.*, 2023; Rezende *et al.*, 2023; Neves *et al.*, 2024).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

O uso de plantas como método terapêutico perpassa milênios de anos(Cunningham; Brinckmann; Yang.,2019). As antigas civilizações utilizavam a natureza como recurso alimentar e medicinal (Jamshidi-Kia; Lorigooini; Amini-Khoei, 2017). O conhecimento da utilização de plantas para a preparação de alimentos e a aplicação como medicamentos foram passadas de forma gradual de geração para geração. Com isso o ser humano foi capaz de suprir suas necessidades básicas por meio de recursos presentes no meio ambiente (Jamshidi-Kia; Lorigooini; Amini-Khoei, 2017).

A Organização Mundial da Saúde define planta medicinal como sendo todo ou qualquer vegetal que possua órgãos ou componentes que são utilizados como método terapêutico ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (OMS,1998;Veiga Junior, Pinto e Maciel, 2005) . Além disso, a OMS reconhece que a medicina tradicional é necessária na maioria dos países em desenvolvimento, considerando que 80% da população nestes países utiliza as práticas tradicionais no tratamento de doenças e desta cerca de 85% utilizam plantas nos cuidados básicos com a saúde (OMS, 2002).

Ricas em compostos bioativos, como alcaloides, antraquinonas, flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos e terpenóides as plantas são a base para a composição de medicamentos, estas podem ser usadas integralmente (a planta toda) ou derivados dela como folhas, raízes, sementes, frutos e cascas (Li *et al.*,2020; Jamshidi-Kia; Lorigooini; Amini-Khoei, 2017).

No Brasil o uso de plantas medicinais é um hábito cultural. Estima-se que 82% da população brasileira faça uso de produtos à base de plantas medicinais (Saude,2012). É comum encontrar raizeiros comercializando plantas medicinais em feiras e mercados municipais (Sen *et al.*,2015). Destaca-se ainda que a expansão da terapia com plantas medicinais deve-se aos efeitos adversos causados por fármacos sintéticos. Esse fato leva

a um crescente aumento no consumo de plantas e, portanto, de tratamentos naturais (Cherobin *et al.*, 2023).

Em 2004, o Ministério da Saúde implementou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com o objetivo de garantir acesso e uso racional das plantas medicinais e dos fitoterápicos, com segurança, eficácia e qualidade, e no ano de 2009, listou 74 plantas com diferentes propriedades terapêuticas, que foram classificadas como de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) (Ribeiro Neto *et al.*, 2020). Nessa lista contém plantas tais como *Achyrocline satureoides*, *Allium sativum*, *Baccharis trimera*, *Melissa officinalis* (Saude, 2006).

Apesar do uso das plantas medicinais ser culturalmente comum, faz-se necessário mais estudos que compreenda o potencial terapêutico dessas plantas, tendo em vista que as regulamentações de prescrição, preparação e consumo das plantas não são claras e rigorosas (Farzaei *et al.*, 2020) é necessário compreender o potencial tóxicoreprodutivo das plantas que são utilizadas para fins terapêuticos, garantindo que estas sejam seguras ao uso.

2.2 *Dipteryx alata*

A família Leguminosae (Fabaceae) é classificada como a terceira maior família entre as angiospermas. Ela contém 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies, com distribuição cosmopolita (Lewis *et al.*, 2005). No Brasil, a família contém 210 gêneros e 2.694 espécies, sendo a família mais diversa no país. Esta família está presente em todos os biomas brasileiros, em especial no Cerrado, com 1.158 espécies; na Floresta Amazônica, com 1.103 espécies; e na Floresta Atlântica, com 939 espécies (Lima *et al.*, 2012). Dentre as espécies dessa família cita-se a *D. alata*.

D. alata é uma árvore arbórea que floresce nas estações chuvosas, e tem seu pico de frutificação nas estações secas (Silvia *et al.*, 2020). É uma planta nativa no cerrado brasileiro, porém não é endêmica, estando presente nas regiões Norte, Nordeste, Centro-

oeste e Sudeste do Brasil, podendo ser encontrada também no Paraguai, Peru e Bolívia(Sano *et al.*, 2016)Essa planta é popularmente conhecida como baru e cumbaru e seus frutos são colhidos entre os meses de julho e outubro (Siqueira *et al.*,2009; Siqueira *et al.*, 2012; Coco *et al.*, 2022).

O fruto de *D. alata* é composto principalmente por casca, polpa e amêndoa, e este pode ser aproveitado integralmente. É comum ser consumido *in natura*, como ingrediente em preparos alimentícios, além de ser extraído o óleo da amêndoa. Nutricionalmente a amêndoa do baru possui alta densidade de nutrientes e proteínas de qualidade, o que caracteriza a amêndoa do baru como fonte complementar de proteínas e nutrientes. No entanto, há poucos estudos desenvolvidos que compreendem seu potencial biológico(Lima *et al.*, 2022).

Na medicina tradicional *D. alata* é utilizado principalmente como anti-inflamatório, antiofídico, cicatrizante, antioxidante e na redução do colesterol. Estudos desenvolvidos com a amêndoa do *D. alata* demonstraram seu potencial antioxidante (Coco *et al.*, 2022), neuroprotetor (Puebla *et al.*, 2010) e probiótico (Alves-Santos *et al.*, 2023).

Um estudo clínico realizado com a castanha do *D. alata* avaliou o efeito da suplementação com óleo da amêndoa de *D.alata* sobre inflamação, estresse oxidativo, composição corporal, perfil lipídico e de ácidos graxos plasmáticos de pacientes em hemodiálise. O estudo demonstrou que o óleo da castanha de *D. alata* diminuiu a concentração de proteína C reativa que indica processo inflamatório, comparado ao grupo placebo, porém o óleo não foi eficaz na melhora da composição corporal, do perfil lipídico e do estresse oxidativo(Schincaglia *et al.*, 2020). Mesmo esse estudo não evidenciando o efeito antioxidante do óleo da amêndoa do *D.alata*, um estudo com o extrato etanólico da castanha do *D.alata* em linhagens de células epiteliais pulmonares humanas demonstrou o efeito antioxidante e cicatrizante do extrato etanólico da castanha do baru (Coco *et al.*, 2022).

Outro estudo foi desenvolvido por Ferraz e colaboradores (2014) que avaliou a capacidade de uma isoflavona derivada do *D. alata*, em neutralizar o efeito neurotóxico e

miotóxico causado pelo veneno da *Bothrops jararacussu in vitro*. Os resultados demonstraram que a isoflavona derivada do *D. alata* neutralizou de forma eficiente a miotoxicidade e a atividade neuromuscular do veneno da *Bothrops jararacuçu* e sua principal mitoxina BthTX-I *in vitro* (Ferraz *et al.*, 2014).

2.3 *Guettarda viburnoides*

A família *Rubiacea* é classificada com a quarta maior família entre as angiospermas. Nela encontra-se catalogadas 13.673 espécies distribuídas em 609 gêneros no mundo (González-Castelazo *et al.*, 2023). No Brasil, estão descritas 1.401 espécies distribuídas em 125 gêneros (Campbell; Rabelo; Cunha, 2016). Essas espécies são encontradas em todo o planeta e, em especial, em zonas quentes e úmidas (González-Castelazo *et al.*, 2023). Dentre essas espécies destaca-se a *Guettarda viburnoides*.

O gênero *Guettarda* é composto por árvores que dão flores perfumadas, tubulares, de cor amarelo-creme de outubro a janeiro e seus frutos são drupas subglobosa que amadurecem do final de março até o início de julho. *G. viburnoides* é uma planta pertencente ao gênero *Guettarda* e está distribuída no Brasil e Paraguai (Loayza, Loiselle e Rios, 2011).

Na medicina popular espécies do gênero *Guettarda* são utilizadas para o tratamento de feridas e inflamações, controle de cólicas menstruais, constipação intestinal e febre (Bhattacharyya e De Almeida, 1985; Oliveira, de *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2022). Não há estudos que compreendam o potencial biológico de *G. viburnoides*, o único estudo pré-clínico encontrado na literatura consultada com *G. viburnoides*, descreveu o efeito antioxidante e anti-inflamatório do extrato bruto testado em camundongos *Swiss*. O estudo avaliou o efeito da administração tópica do extrato bruto de *G. viburnoides* no edema de orelha, induzido nos camundongos por óleo de cróton. Os resultados evidenciaram que o extrato bruto e frações foram capazes de eliminar os radicais livres, além disso o extrato bruto e todas as frações deste, diminuíram o edema de orelha (Naressi *et al.*, 2015).

Estudos encontrados com outras plantas do gênero *Guettarda* evidenciam o efeito anti-inflamatório das plantas desse gênero, um estudo com *Guettarda pohliana* avaliou o

efeito anti-inflamatório dos extratos etanólicos bruto das folhas e raízes, no estudo realizado utilizou-se camundongos *Swiss* machos e fêmeas, um modelo de edema de orelha foi induzido por óleo de cróton, os animais foram tratados com o extrato bruto das folhas e raízes, posteriormente os animais passaram por eutanásia e avaliou-se o potencial anti-inflamatório da planta, os resultados desse estudo evidenciaram o efeito anti-inflamatório de *G. pohliana* (Testa *et al.*, 2012)

Outro estudo realizado avaliou a toxicidade de *Guettarda platypoda*, nesse estudo utilizou-se o extrato etanólico das cascas da raiz da *G. platypoda*, para avaliação da toxicidade aguda utilizou-se camundongos fêmeas adultas *Mus musculus*, o ensaio foi baseado de acordo com a OCDE 423(2001), nos resultados observou-se que houve alguns sinais incomuns nos camundongo nos primeiros 60 minutos logo após a administração, porém no final do estudo não registrou-se nenhum óbito indicando que a DL50 do extrato foi superior a 2000mg/Kg e 3000mg/Kg. Esse mesmo estudo avaliou também o potencial anti-inflamatório e antitumoral do extrato de *G. platypoda*, ambos os testes o extrato demonstrou efeitos satisfatório, no entanto no teste de efeito antitumoral o extrato demonstrou esse promissor somente no tumor sarcoma 180 (Pina *et al.*, 2012).

2.4 Gestação e plantas medicinais

A gravidez é um processo biológico no qual a gestante passa por diversas alterações fisiológicas. Essas alterações podem levar a náuseas, vômitos, prisão de ventre e azia (Marsili *et al.*, 2023) É comum durante este período, a mulher fazer uso de plantas medicinais para aliviar estes sintomas. As plantas medicinais consistem em um método alternativo para substituir fármacos convencionais, acredita-se que por serem naturais não causam danos ao feto. Entretanto, o uso indiscriminado de plantas medicinais sem acompanhamentos ou estas combinadas a fármacos podem trazer prejuízos graves a mãe e ao feto (Bernstein *et al.*, 2021).

O uso de medicamentos, plantas medicinais ou estes dois concomitantemente é uma realidade de mais de 90% das mulheres no período de gestação. Isto acontece devido às variáveis culturais e socioeconômicas, à desigualdade do atendimento médico ou à falta

deste e à dificuldade de acesso a medicamentos. Estes problemas fazem com que as gestantes busquem alternativas, se automedicando e fazendo o uso de plantas medicinais, e até mesmo combinando estas duas vias terapêuticas (Bekele *et al.*, 2023).

Um levantamento realizado no Sistema Único de Saúde (SUS), no sul do Brasil, identificou em Unidades Básicas de Saúde que 91,6% dos pacientes atendidos fizeram uso de plantas medicinais em algum momento da vida para tratamento de doenças. Deste total, 71,5% eram mulheres e 81,5% dos pacientes relataram que o conhecimento adquirido sobre o uso de plantas medicinais foi passado de pais para filhos (Oliveira *et al.*, 2012).

As plantas medicinais e os fitoterápicos contêm componentes químicos que podem ser tóxicos para a mulher e o feto durante o período de gestação. Os efeitos causados pelo uso indiscriminado de plantas medicinais, podem incluir embriotoxicidade, efeitos teratogênicos e abortivos (Lewicka *et al.*, 2019). Compostos presentes nas plantas podem atravessar a placenta e atingir o feto. Sabe-se que alguns compostos induzem a contração uterina e o desequilíbrio hormonal podendo levar inclusive ao aborto (Bernstein *et al.*, 2021).

Até o presente momento o conhecimento sobre o potencial teratogênico da maioria das plantas é escasso e limitado. Mas, há estudos de plantas que são utilizadas para interromper a gestação como é o caso do *Peumus boldus* (Almeida; Melo; Xavier, 2000) e da *Baccharis genistelloides* (Alonso, 1998). Essas plantas possuem potencial embriotóxico e teratogênico, ou seja, caso a gestação não seja interrompida com o uso da planta, o feto pode nascer com malformações ou outros problemas relacionados à saúde (Wen *et al.*, 2020)

Mesmo o conhecimento dos efeitos tóxicos das plantas medicinais sendo limitado, há estudos que comprovam a segurança do uso de diversas plantas durante a gestação como é o caso do *Blutaparon portulacoides* (Neves *et al.*, 2024) *Doliocarpus dentatus* (Ishikawa *et al.*, 2018), *Gomphrena celosioides* (Salustriano *et al.*, 2022), *Alternanthera littoralis* (Rezende *et al.*, 2023). No entanto, algumas plantas possuem também potencial teratogênico como a *Salvia lachnostachys Benth* (Ortiz *et al.*, 2023), *Piper glabratum* Kunth (Nunes *et al.*, 2023) *Casearia sylvestris* (Nagaoka *et al.*, 2023) e *Peumus boldus* (Almeida, Melo e Xavier, 2000).

2.4 Teratologia e malformações

O termo teratologia vem de *teratos* = monstro e *logos* = estudo. A teratologia, como ciência, foi definida há cerca de 60 anos. Entretanto, a procura pela compreensão da causa das malformações humanas existe há milênios. O conhecimento social baseado em crenças fazia sentido nas antigas civilizações que atribuíam a presença de malformações a eventos punitivos, maldições e/ou a outros sem causas justificáveis. Como solução, a sociedade sacrificava os indivíduos considerados inaptos (De Sesso, 2019).

O agente teratogêno é classificado como qualquer agente físico, químico, biológico ou estado de deficiência que altera o desenvolvimento embrionário levando à modificação nas estruturas ou funções biológicas do feto. O agente teratogêno pode influenciar de diversas maneiras a reprodução humana levando ao aborto, retardo do crescimento intrauterino ou malformações congênitas. Isso dependerá do estágio de desenvolvimento do feto, da frequência de exposição da mãe ao agente, do genótipo materno-fetal do e mecanismo patogênico específico de cada agente (Valladares, Rasmussen., 2022).

De acordo com a Organização Pan- Americana de Saúde, cerca de 8 milhões de crianças no mundo nascem com anomalia congênita a cada ano, destas cerca de 3 milhões morrem antes de completarem 5 anos de idade. Na América Latina cerca de 21% das crianças morrem antes dos 5 anos por causa de anomalias congênitas, e um a cada cinco bebês morrem antes de completarem 21 dias de vida (Saúde, 2020).

As malformações são caracterizadas como anomalias congênitas maiores que resultam em graves defeitos anatômicos, funcionais ou estéticos, podendo gerar óbito, e anomalias menores que na maior parte dos casos não precisam de intervenções cirúrgicas, médicas ou estéticas. Estas malformações menores, sobrepõem-se aos fenótipos normais, podem ser únicas ou múltiplas e associar-se a malformações maiores (Rodrigues *et al.*, 2014).

Considerando a ampla utilização de *D. alata* e *G. virbunoides* em regiões do Brasil como recurso medicinal e que estas plantas podem ser utilizadas por mulheres durante o período gestacional. Sabendo-se que o uso indiscriminado de plantas como recurso medicinal pode interferir na saúde reprodutiva da mulher, induzindo aborto, diminuindo a qualidade de vida do feto, causando malformações ou levando ao óbito. É necessário compreender os efeitos reprodutivos e embriofetal causado por essas plantas no período gestacional.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de plantas medicinais no desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a toxicidade materna e o desempenho reprodutivo de camundongos *Swiss* (fêmeas) tratados com seiva de *D. alata* e com o extrato etanólico de *G. viburnoides*.

Investigar o potencial teratogênico da seiva de *D. alata* e do extrato etanólico de *G. viburnoides* sobre os fetos exposto intrauterino por meio de análise externa, visceral e esquelética.

4. METODOLOGIA

4.1 Material vegetal e preparação do extrato da seiva bruta de *D. alata*

A seiva bruta de *D. alata* foi coletada em julho de 2018 no município de Terenos-MS, Brasil, na Fazenda Riqueza, situada na estrada Terenos-Alonso Km 32 (20°, 17'01" S 54° 59'23,88" W). A espécie coletada foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o número 69846 CGMS. A planta foi cadastrada no Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Genéticos e conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen # A7716EC). Para a retirada da seiva do xilema do tronco da *D. alata*, foi utilizada uma broca de aço (0,50 m de comprimento x 0,015 m de diâmetro) para fazer uma perfuração a $1,4 \pm 0,2$ metros de altura. Após a perfuração inseriu-se uma mangueira para a coleta da seiva em um recipiente estéril. Coletou-se 200 mL de seiva de cada árvore. Ao final foi realizado um *pool* de todas as seivas para a obtenção de uma amostra representativa.

4.2 Material vegetal e preparação do extrato etanólico de *G. viburnoides*

Folhas e caules de *G. viburnoides* foram coletados (Dourados – MS) e identificados pela Dra. Zefa Valdevina Pereira e um espécime voucher foi depositado sob o código de identificação DDMS2311. A autorização para acesso e estudo de amostras do patrimônio genético brasileiro foi obtida junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen - A163977).

Para a preparação do extrato etanólico folhas e caules foram lavados, secos e pulverizados (120 g). A extração por maceração foi realizada com metanol (4 L) durante 30 dias. O extrato foi então filtrado, concentrado sob pressão e liofilizado para obtenção do extrato etanólico(EEGV) (47 g), que foi armazenado sob refrigeração a 4 °C.

4.3 Animais experimento *D. alata*

Foram utilizados 60 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, sendo 40 fêmeas e 20 machos, em idade reprodutiva (8-10 semanas). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais foram ambientados para adaptação durante um período de 7 dias em mini-isoladores de polisulfona, cobertas com maravalha de pinus, em rack ventilada Alesco® e mantidos em temperatura controlada 22°C (± 2 °C) com ciclo claro/escuro de 12 h, umidade de 55% ($\pm 10\%$) e livre acesso a água filtrada e ração comercial (Nuvital®). A pesquisa foi realizada de acordo com os protocolos da Declaração Universal dos Direitos Animais e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o parecer # 1.328/2024.

4.4 Animais experimento *G. viburnoides*

Foram utilizados 45 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, sendo 30 fêmeas e 15 machos, em idade reprodutiva (8-10 semanas). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais foram ambientados para adaptação durante um período de 7 dias em mini-isoladores de polisulfona, cobertas com maravalha de pinus, em rack ventilada Alesco® e mantidos em temperatura controlada 22°C (± 2 °C) com ciclo claro/escuro de 12 h, umidade de 55% ($\pm 10\%$) e livre acesso a água filtrada e ração comercial (Nuvital®). A pesquisa foi realizada de acordo com os protocolos da Declaração Universal dos Direitos Animais e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o parecer # 1.328/2024.

4.5 Delineamento experimental *D. alata*

Os animais foram acasalados *overnight* na proporção de 2 fêmeas: 1 macho. A detecção da prenhez foi realizada por meio da observação do *plug* vaginal, sendo este

considerado o dia zero de gestação (Oliveira et al., 2009; Gonçalves et al., 2013; David et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Ishikawa et al., 2018; Vani et al., 2018). As fêmeas prenhes foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos experimentais (n=10): Controle - os animais receberam o veículo do SDa (água destilada) na proporção de 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c.), por via oral (v.o.), do 1º ao 18º dia gestacional (d.g.); Grupo SDa25, 50 e 75- os animais receberam a SDa nas doses de 25,50 e 75% (p.c., v.o.), do 1º ao 18º d.g, respectivamente.

4.6 Delineamento experimental *G. viburnoides*

Os animais foram acasalados *overnight* na proporção de 2 fêmeas: 1 macho. A detecção da prenhez foi realizada por meio da observação do *plug* vaginal, sendo este considerado o dia zero de gestação (Oliveira et al., 2009; Gonçalves et al., 2013; David et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Ishikawa et al., 2018; Vani et al., 2018). As fêmeas prenhes foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos experimentais (n=10): Controle - os animais receberam o veículo do EEGV (soro fisiológico) na proporção de 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c.), por via oral (v.o.), do 1º ao 18º dia gestacional (d.g.); Grupo EMGV300, EMGV1000- os animais receberam o EEGV nas doses de 300 e 1000 mg/Kg (p.c., v.o.), do 1º ao 18º d.g, respectivamente.

4.7 Ensaios Biológicos

Os ensaios biológicos foram executados de maneira semelhante nos 2 experimentos, com as coletas dos materiais para as avaliações toxicogenéticas feitas em 3 tempos diferentes, sendo estes T1, T2 e T3 referentes ao 16º, 17º e 18º dias de gestação (d.g.), respectivamente. No 18º d.g., os animais foram submetidos à eutanásia seguida de laparotomia, histerectomia e onfalectomia para a coleta, pesagem e devido armazenamento dos órgãos (pulmão, coração, baço, fígado, rins, placenta) os fetos para análise posterior.

4.8 Parâmetros biométricos

Os parâmetros biométricos, em ambos os experimentos, foram calculados a partir dos registros de peso inicial (fêmeas pesadas no dia zero), peso final (fêmeas pesadas no 18º d.g.), ganho de peso (peso final - peso inicial), peso do útero, ganho de peso líquido (ganho de peso - peso do útero), pesos absolutos e relativos do coração, pulmão, baço, rins e fígado.

4.9 Desenvolvimento Embriofetal

Os fetos retirados foram pesados e passaram por análise sistemática de malformações externas e sexagem. Em seguida, foram distribuídos aleatoriamente em dois subgrupos, cada um com 50% da ninhada. Os fetos do primeiro grupo foram fixados em solução de Bodians por pelo menos sete dias e destinados à análise visceral por meio de microdissecção com cortes estratégicos, para o estudo de tórax e abdômen propostos por Barrow e Taylor (1969) e para estudo da cabeça segundo Wilson (1965), com alterações propostas por Wise *et al.* (1997), Oliveira *et al.* (2005), Damasceno *et al.* (2008), Oliveira *et al.* (2009) e Oliveira *et al.* (2015)

A classificação das alterações viscerais foi baseada, principalmente nos trabalhos de Taylor (1986), Manson e Kang (1994), Damasceno *et al.* (2008), Oliveira *et al.* (2009) e Oliveira *et al.* (2015). Os fetos do segundo subgrupo foram fixados em acetona pura por pelo menos sete dias e destinados à análise esquelética pela técnica descrita por Staples e Schnell (1964) e modificada por Oliveira *et al.* (2009). Após a fixação, os fetos foram eviscerados para o processo de diafanização em solução de KOH (0,8%). Em seguida, foram adicionadas quatro gotas de alizarina, e esta solução foi trocada a cada 24 horas durante quatro dias consecutivos. Depois dos fetos corados, a solução de KOH foi substituída pela solução clareadora (1 litro de glicerina: 1 litro de álcool etílico: 0,5 litro de álcool benzílico) e trocada a cada 24 horas, durante cinco dias. As classificações foram

feitas segundo Taylor (1986), Manson e Kang (1994), Wise *et al.* (1997). Damasceno *et al.* (2008), Oliveira *et al.* (2009) e Oliveira *et al.* (2015).

As análises de vísceras e esqueletos foram realizadas em lupa estereomicroscópica (Nikon® – SMZ 745T) com aumento de 4 vezes.

A classificação do peso fetal segundo a idade gestacional foi feita conforme proposto por Soulimane-Mokhtari *et al.* (2005). Após a coleta dos fetos dos cornos uterinos, eles foram pesados e de acordo com a média $\pm 1,7 \times$ desvio padrão (DP) dos pesos corporais 32 obtidos no grupo controle, foram classificados em adequados para idade gestacional (AIG), pequenos para a idade gestacional (PIG) e grandes para a idade gestacional (GIG). e segundo Oliveira *et al.* (2009) - os fetos foram classificados como fetos com peso adequado para a idade da prenhez (PAIP) quando o peso do feto estava compreendido entre média de peso dos fetos do grupo controle mais ou menos o desvio padrão; fetos com baixo peso para a idade de prenhez (BPIP) quando o peso do feto é inferior à média de peso dos fetos do grupo controle menos o desvio padrão deste mesmo grupo; e fetos com elevado peso para a idade de prenhez (EPIP) quando o peso do feto é superior à média do peso dos fetos do grupo controle mais o desvio padrão deste mesmo grupo. Soulimane-Mokhtari *et al.* (2005) classifica os pesos dos fetos individualmente e Oliveira *et al.* (2009) classifica a ninhada de forma geral.

5. Desempenho Reprodutivo

Foram registrados, em ambos os experimentos, o número de sítios de implantação (n° de fetos vivos + n° de fetos mortos + n° de reabsorções) e reabsorção, além do número de fetos vivos mortos e do peso fetal e placentário. Com base nestes dados, obteve-se: a viabilidade fetal ($\text{número de fetos vivos} \times 100 / \text{número de implantações}$), taxa de perda pós-implantação [$(\text{número de implantações} - \text{número de reabsorções}) \times 100 / \text{número de implantações}$], taxa de reabsorção (n° de reabsorções $\times 100 / n^\circ$ de implantes), índice placentário (peso da placenta / peso fetal), eficiência placentária (peso fetal / peso placentário) e razão sexual ($\text{número de fetos machos} / \text{número de fetos fêmeas}$).

6. Análise Estatística

Em todos os experimentos, para dados com distribuição normal foi utilizado o teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Para os demais dados utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Para comparações de frequências utilizou-se o teste do Quiquadrado. As análises foram realizadas pelo programa GraphPad InStat® (Versão 3.06, 2003). Os dados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média ou média $\pm$ desvio padrão e o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS, DISCUSSÃO

Os resultados e discussão referentes ao experimento realizado com a seiva de *D. alata* serão apresentados em forma de artigo (Anexo 1).

Os resultados e discussão referentes ao experimento realizado com o extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* serão apresentados em forma de artigo (Anexo 2).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seiva de *D. alata* apresentou baixo potencial teratogênico e não alterou o desempenho reprodutivo de camundongos *Swiss* fêmeas. No entanto, o seu uso não é recomendado no período gestacional, devido em especial, ao aumento de malformações externas.

O extrato etanólico de *G. Viburnoides* apresentou baixo potencial teratogênico, não alterou o desempenho reprodutivo nem o desenvolvimento embriofetal de camundongos *Swiss* fêmeas. Assim, seu uso na gestação não seria contra indicado, no entanto, deve ser feito com cautela.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. R.; MELO, A. M.; XAVIER, H. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. **Phytotherapy research: PTR**, v. 14, n. 2, p. 99–102, mar. 2000.

ALONSO, J. R. Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. *Em: Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas*. [s.l: s.n.]. p. 1039–1039.

ALVES-SANTOS, A. M. *et al.* Chemical composition and prebiotic activity of baru (*Dipteryx alata* Vog.) pulp on probiotic strains and human colonic microbiota. **Food Research International**, v. 164, p. 112366, 1 fev. 2023.

BEKELE, G. G. *et al.* Concomitant use of medicinal plants and pharmaceutical drugs among pregnant women in southern Ethiopia. **Heliyon**, v. 9, n. 4, 1 abr. 2023.

BERNSTEIN, N. *et al.* Is it safe to consume traditional medicinal plants during pregnancy? **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 4, p. 1908–1924, abr. 2021.

BHATTACHARYYA, J.; DE ALMEIDA, M. Z. Isolation of the Constituents of the Root-Bark of *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 1, p. 148–149, jan. 1985.

CAMPBELL, G.; RABELO, G. R.; CUNHA, M. D. Ecological significance of wood anatomy of *Alseis pickelii* Pilg. & Schmale (Rubiaceae) in a Tropical Dry Forest. **Acta Botanica Brasilica**, v. 30, p. 124–130, mar. 2016.

CHEROBIN, F. *et al.* Plantas medicinais e políticas públicas de saúde: novos olhares sobre antigas práticas. **Physis (Rio de Janeiro, Brazil)**, v. 32, n. 3, 2022.

CUNNINGHAM, A. B. *et al.* Introduction to the special issue: Saving plants, saving lives: Trade, sustainable harvest and conservation of traditional medicinals in Asia. **Journal of ethnopharmacology**, v. 229, p. 288–292, 2019

COCO, J. C. *et al.* In vitro antioxidant and wound healing properties of baru nut extract (*Dipteryx alata* Vog.) in pulmonary epithelial cells for therapeutic application in chronic

pulmonary obstructive disease (COPD). **Natural Product Research**, v. 36, n. 17, p. 4469–4475, 1 set. 2022.

DAVID, N. DE *et al.* Gochnatia polymorpha ssp. floccosa: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 370–379, 11 jun. 2014.

DESESSO, J. M. The arrogance of teratology: A brief chronology of attitudes throughout history. **Birth Defects Research**, v. 111, n. 3, p. 123–141, 1 fev. 2019.

ESTEVEZ-PEDRO, N. M.; RODAS, ANDREA C. D.; *et al.* Implementation of the three Rs in the human hazard assessment of Brazilian medicinal plants: an evaluation of the cytotoxic and genotoxic potentials of *Dipteryx alata* Vogel. **Alternatives to laboratory animals: ATLA**, v. 39, n. 2, p. 189–196, maio 2011.

ESTEVEZ-PEDRO, N. M.; RODAS, ANDREA C.D.; *et al.* Implementation of the Three Rs in the Human Hazard Assessment of Brazilian Medicinal Plants: An Evaluation of the Cytotoxic and Genotoxic Potentials of *Dipteryx alata* Vogel. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 39, n. 2, p. 189–196, 1 maio 2011.

FARZAEI, M. H. *et al.* Poisoning by Medical Plants. **Archives of Iranian Medicine**, v. 23, n. 2, p. 117–127, 1 fev. 2020.

FERRAZ, M. C. *et al.* An Isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is Active against the in Vitro Neuromuscular Paralysis of Bothrops jararacussu Snake Venom and Bothropstoxin I, and Prevents Venom-Induced Myonecrosis. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5790–5805, 6 maio 2014.

GAITÉN, Y. I. G. *et al.* Phytochemical profile, acute dermal toxicity and wound healing activity of *Guettarda calyptrata* A. Rich. **Journal of Herbmmed Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 249–256, 7 jan. 2021.

GONÇALVES, C. A. *et al.* Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: Teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 843–850, 12 dez. 2013.

GONZÁLEZ-CASTELAZO, F. *et al.* Plants of the Rubiaceae Family with Effect on Metabolic Syndrome: Constituents, Pharmacology, and Molecular Targets. **Plants**, v. 12, n. 20, p. 3583, 15 out. 2023.

ISHIKAWA, R. B. *et al.* The safe use of *Doliocarpus dentatus* in the gestational period: Absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 1–6, 10 maio 2018.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbmmed Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 29 dez. 2017.

KAM, P. C.; BARNETT, D. W.; DOUGLAS, I. D. Herbal medicines and pregnancy: A narrative review and anaesthetic considerations. **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 47, n. 3, p. 226–234, 1 maio 2019.

KIM, K. H. *et al.* The methanol extract of *Guettarda speciosa* Linn. Ameliorates acute lung injury in mice. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, p. 40, 7 fev. 2020.

KUMARI, K. M. U.; YADAV, N. P.; LUQMAN, S. Promising essential oils/plant extracts in the prevention and treatment of dandruff pathogenesis. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 22, n. 13, p. 1104–1133, 2022

LEE, D. *et al.* *Guettarda crispiflora* Vahl Methanol Extract Ameliorates Acute Lung Injury and Gastritis by Suppressing Src Phosphorylation. **Plants**, v. 11, n. 24, p. 3560, jan. 2022.

LEWICKA, A. *et al.* Supplementation of plants with immunomodulatory properties during pregnancy and lactation-maternal and offspring health effects. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1958, 2019.

LI, Y. *et al.* The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 148, p. 80–89, 2020

LIMA, D. C. *et al.* A review on Brazilian baru plant (*Dipteryx alata* Vogel): morphology, chemical composition, health effects, and technological potential. **Future Foods**, v. 5, p. 100146, 1 jun. 2022.

LOAYZA, A. P.; LOISELLE, B. A.; RIOS, R. S. Context-dependent recruitment of *Guettarda viburnoides* in a Neotropical forest–savanna mosaic. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 8, p. 1317–1326, 2011.

MOGHARRABI, M. *et al.* The effects of nanomicelle of curcumin on the matrix metalloproteinase (MMP-2, 9) activity and expression in patients with coronary artery disease (CAD): A randomized controlled clinical trial. **ARYA Atherosclerosis**, v. 16, n. 3, p. 136–145, maio 2020.

NAGAOKA, L. T. *et al.* Maternal–fetal safety evaluation of an aqueous extract of *Casearia sylvestris* leaves in rats. **Birth Defects Research**, v. n/a, n. n/a, [s.d.].

NARESSI, M. A. *et al.* CHEMICAL CONSTITUENTS, ANTI-INFLAMMATORY, AND FREE-RADICAL SCAVENGING ACTIVITIES OF *Guettarda viburnoides* CHAM. & SCHLTDL. (RUBIACEAE). **Química Nova**, v. 38, p. 932–936, ago. 2015.

NEVES, S. C. DAS *et al.* Absence of adverse effects of *Blutaparon portulacoides* (A.St.-Hil.) Mears in mice exposed during pregnancy. **South African Journal of Botany**, v. 166, p. 52–59, 1 mar. 2024.

NUNES, R. C. S. *et al.* The Ethanolic Extract of *Piper glabratum* Kunth Is Teratogenic and Interferes with the Ossification Process of Swiss Mice Fetuses. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 3, p. 430, 11 mar. 2023.

OLIVEIRA, A. K. M. D. *et al.* Effect of frugivory on the germination of cumbaru (*Dipteryx alata*) seeds ingested by tapirs (*Tapirus terrestris*) in the area of Cerrado, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, p. e20211266, 5 dez. 2022.

OLIVEIRA, P. R. N. DE *et al.* Cytotoxic activity of *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1677–1681, 1 set. 2013.

OLIVEIRA, S. G. D. *et al.* An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 428–437, 27 mar. 2012.

ORTIZ, H. C. *et al.* The ethanolic extract of *Salvia lachnostachys* Benth is not maternotoxic, does not alter reproductive performance, but has teratogenic potential. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, p. 145, 4 maio 2023.

PINA, E. M. L. *et al.* Pharmacological screening and acute toxicity of bark roots of *Guettarda platypoda*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1315–1322, dez. 2012.

PEDROSO, R. DOS S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis (Rio de Janeiro, Brazil)**, v. 31, n. 2, 2021

PRINSLOO, G.; NOGEMANE, N.; STREET, R. The use of plants containing genotoxic carcinogens as foods and medicine. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 116, n. Pt B, p. 27–39, jun. 2018.

PUEBLA, P. *et al.* Chemical Constituents of the Bark of *Dipteryx alata* Vogel, an Active Species against *Bothrops jararacussu* Venom. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 8193–8204, 12 nov. 2010.

REN, Y.; KINGHORN, A. D. Natural product triterpenoids and their semi-synthetic derivatives with potential anticancer activity. **Planta medica**, v. 85, n. 11–12, p. 802–814, 2019.

REIS, M. Á. *et al.* Hepatoprotective and Antioxidant Activities of Oil from Baru Almonds (*Dipteryx alata* Vog.) in a Preclinical Model of Lipotoxicity and Dyslipidemia. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. e8376081, 2 out. 2018.

REZENDE, G. C. D. *et al.* Absence of maternal-fetal adverse effects of *Alternanthera littoralis* P. Beauv. following treatment during pregnancy in mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 86, n. 16, p. 543–556, 18 ago. 2023.

RIBEIRO NETO, J. A. *et al.* Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 260, p. 112547, 5 out. 2020.

RODRIGUES, L. DOS S. *et al.* Características das crianças nascidas com malformações congênitas no município de São Luís, Maranhão, 2002-2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 2, p. 295–304, jun. 2014.

ROSA, A. C. G. *et al.* Transfer of Metal(loid)s from Soil to Leaves and Trunk Xylem Sap of Medicinal Plants and Possible Health Risk Assessment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 2, p. 660, jan. 2022.

SALUSTRIANO, F. R. *et al.* The Ethanolic Extract of *Gomphrena celosioides* Mart. Does Not Alter Reproductive Performance or Embryo-Fetal Development, nor Does It Cause Chromosomal Damage. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 2369, nov. 2022.

SANO, S. M. *et al.* *Dipteryx alata*: Baru. 2016.

SCHINCAGLIA, R. M. *et al.* Efeitos da suplementação com óleo de amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vog.) na composição corporal, inflamação, estresse oxidativo, perfil lipídico e ácidos graxos plasmáticos de pacientes em hemodiálise: um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 52, p. 102479, 1 ago. 2020.

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 147, p. 59–110, 2015.

SILVA, F. B. *et al.* *Dipteryx alata*, a tree native to the Brazilian Cerrado, is sensitive to the herbicide nicosulfuron. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 29, n. 2, p. 217–225, 2020.

SIQUEIRA, E. M. DE A. *et al.* Consumption of baru seeds [*Dipteryx alata* Vog.], a Brazilian savanna nut, prevents iron-induced oxidative stress in rats. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 427–433, 1 jan. 2012.

SOUZA, P. DE *et al.* Promising Medicinal Plants with Diuretic Potential Used in Brazil: State of the Art, Challenges, and Prospects. **Planta Medica**, v. 87, n. 1/2, p. 24–37, fev. 2021.

SOUZA, R. G. M. DE *et al.* A baru almond–enriched diet reduces abdominal adiposity and improves high-density lipoprotein concentrations: a randomized, placebo-controlled trial. **Nutrition**, v. 55–56, p. 154–160, 1 nov. 2018.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 435–440, jul. 2010.

TEHSEEN, I. *et al.* Antidiabetic and hepato-renal protective effects of medicinal plants in STZ induced diabetic rats. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e260189, 10 jun. 2022.

TESTA, G. *et al.* Constituintes químicos das folhas e avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos das raízes e folhas de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 35, p. 527–529, 2012.

THABIT, S. *et al.* Evaluation of antioxidant and neuroprotective activities of *Cassia fistula* (L.) using the *Caenorhabditis elegans* model. **PeerJ**, v. 6, p. e5159, 13 jul. 2018.

TAYLOR, P. Practical teratology. London: Academic Press.1986.

VALLADARES, D. A.; RASMUSSEN, S. A. An update on teratogens for pediatric healthcare providers. **Current opinion in pediatrics**, v. 34, n. 6, p. 565–571, 2022

WEN, P. *et al.* Genotoxicity and teratogenicity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berry oil. **Drug and chemical toxicology**, v. 43, n. 4, p. 391–397, 2020.

WILSON, J.G., 1965. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. **Teratology**, 262-277.

WISE, L.D., BECK, S.L., BELTRAME, D., BEYER, B.K., CHAHOUD, I., CLARK, R.L., CLARK, R., DRUGA, A.M., FEUSTON, M.H., GUITTIN, P., HENWOOD, S.M., KIMMEL, C.A., LINDSTROM, P., PALMER, A.K., PETRERE, J.A., SOLOMON, H.M., YASUDA, M., YORK, R.G., 1997. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1). **Teratology**, v. 55, n. 4, p. 249-292, 1997.

ANEXO 1

A seiva de *Dipteryx alata* tem baixo potencial teratogênico e não altera o desempenho reprodutivo de camundongos fêmeas Swiss

Thais Arruda de Santana Biss^{1,2*}, Ana Carla Gomes Rosa^{2*}, Karuppusamy Arunachalam^{1,2}, Camila do Nascimento Moreira¹, Silvia Cordeiro das Neves^{1,2}, Henrique Rodrigues Scherer Coelho¹, Marcelo Luiz Brandão Vilela¹, Cláudia Andréa Lima Cardoso³, Valter Aragão do Nascimento², Rodrigo Juliano Oliveira^{1,2}

¹Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen), Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Centro de Estudos em Recursos Naturais, UEMS, Dourados 79804-970, Brasil

*TASB e ACGR contribuíram igualmente.

Resumo

Dipteryx alata é uma árvore perene encontrada em todas as regiões do Brasil e também no Paraguai. Na medicina popular usa-se a planta integralmente, na forma de decocções, infusões, maceração e cataplasmas e/ou sua seiva. A indicação popular dessa planta é para inflamação, emagrecimento, picadas de cobras, como cicatrizante e para o tratamento do colesterol alto. Como gestantes podem ser acometidas por esses processos, elas podem fazer o uso dessa estratégia terapêutica. Assim, avaliou-se os efeitos da seiva de *D. alata* no desempenho reprodutivo e no desenvolvimento embriofetal em camundongos Swiss. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupo (n=10): Grupo Controle – os animais receberam o veículo (água destilada) na proporção de 0,1 mL/10 g de peso corporal (p.c.) por via oral (gavagem; v.o.), do 1º ao 18º dia de gestação (d.g.); Grupo Seiva de *Dipteryx alata* (SDa) - os animais foram tratados na proporção de 0,1mL/10 g (p.c.; v.o.) com SDa nas proporções de 25, 50 e 75% do 1º ao 18º d.g. Os resultados demonstraram que a SDa não alterou o desempenho reprodutivo. Porém, alterou o desenvolvimento embriofetal. A maior dose de SDa aumentou o peso fetal, o peso placentário, o índice placentário, a

frequência de hiperextensão de membros e de escoliose. Além disso, reduziu a eficiência placentária. Já a menor dose aumentou a frequência global de malformação esquelética. Todas as doses reduziram a frequência de malformações viscerais. Frente ao exposto, considera-se que SDa não altera o desempenho reprodutivo de fêmeas, altera o desenvolvimento embriofetal e tem baixo potencial teratogênico.

Palavras-chaves: malformação, plantas medicinais, reprodução, desenvolvimento embriofetal.

Introdução

A família Fabacea, pertencente a Ordem Fabales, reúne 36 tribos, 727 gêneros e 19.325 espécies e é, portanto, a terceira maior família de plantas no mundo. Estas são encontradas em praticamente todas as formações vegetais existentes no planeta. Entretanto, ela é cosmopolita de regiões neotropicais. No Brasil, a família é representada por 2.807 espécies agrupadas em 222 gêneros (15 endêmicos), incluindo o *Dipteryx*, abundante em quase todos os biomas e ecossistemas do país (Lewis *et al.*, 2005; Queiroz 2009; Lima *et al.*, 2013; Córdula; Morim; Alves, 2014).

O gênero *Dipteryx* reuni cerca de 13 espécies e os constituintes químicos relacionado às atividades biológicas presente nas espécies do gênero são cumarinas, isoflavonas, triterpenóides, ácidos graxos e diterpenóides furanocassanos (Mendes; Silveira, 1994; Vieira Júnior *et al.*, 2007) com potenciais atividades antifúngicas, antioxidante, probiótico e antiofídicas (Ferraz *et al.*, 2014; Ferraz *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2018; Sousa *et al.*, 2022; Alves-Santos *et al.*, 2023).

Dipteryx alata é uma árvore perene nativa do cerrado brasileiro que possui tronco liso ou com placas descamantes irregulares; folhas alternas, compostas pinadas, pecioladas, sem estipulas e raque alada; inflorescência do tipo panícula; flores hermafroditas; e fruto do tipo legume drupoíde em formato ovóide, levemente achatado de cor marrom, constituído por um epicarpo fino, um mesocarpo marrom de consistência macia que constitui a polpa, um endocarpo lenhoso de cor amarelo- esverdeado com uma camada esponjosa e semente em formato elipsoíde que apresenta formatos variáveis entre arvores mas uniforme por árvore, de cor variando de marrom amarelada ou avermelhada podendo ser quase preta.(Ferreira *et al.*, 1998; Esteves-Pedro *et al.*, 2012; Sano; Brito; Ribeiro., 2016).

D. alata é conhecida por seu valor nutricional, sendo consumida integralmente. As folhas e cascas da árvore são utilizadas para infusões, decocções, macerações e como cataplasma. Apesar de não haver registros escritos, a comunicação pessoal de habitantes do interior do Bioma Pantanal indica inclusive o consumo de sua seiva. (Rosa *et al.*, 2022). Os frutos, a castanha e a polpa são usadas para a preparação de óleos e produtos alimentícios (Sano; Brito; Ribeiro, 2016). O fruto é rico em ferro, zinco, cálcio, proteínas,

ácidos graxos insaturados e compostos bioativos como tocoferóis, ácido fítico e taninos (Siqueira *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2020; Medeiros *et al.*, 2023).

Na literatura o nome popular de *D. alata* pode ser baru (Chañi-Paucar *et al.*, 2021) ou cumbaru (Oliveira *et al.*, 2022). Essa planta é às vezes confundida com a *Dipteryx adorata*, planta do mesmo gênero, conhecida como cumaru (Rodrigues *et al.*, 2018).

A indicação popular de *D. alata* é para picadas de cobras (Ferraz *et al.*, 2014), como cicatrizante (Coco *et al.*, 2022), para a redução do colesterol (Souza de *et al.*, 2018), como antioxidante (Reis *et al.*, 2018) e para perda de peso (Souza *et al.*, 2018).

Apesar da utilização de *D. alata* na medicina popular para o tratamento de diversas doenças e sintomas, a literatura consultada demonstrou limitação de informações sobre o seu potencial farmacológico e toxicológico, em especial, sobre a seiva. Em relação à toxicidade aguda, de acordo com Esteves-Pedro *et al.* (2011) a DL₅₀ do extrato hidroalcolólico de *D. alata* foi de 705 mg/Kg (cálculo teórico (ICCVAM, 2006) a partir da IC₅₀ de 0,164µg/mL). Segundo Esteves-Pedro *et al.* (2012) o extrato aquoso da casca de *D. alata* (0,5g/Kg) é seguro se administrado a ratos Wistar do dia zero ao 21º dia gestacional (d.g.) por não alterar o desempenho reprodutivo e o desenvolvimento embriofetal. No entanto, destaca-se que esse estudo não realizou uma análise sistemática das malformações viscerais. Sobretudo destaca-se ainda que nenhum estudo foi conduzido para a seiva no que se refere aos seus efeitos sobre o desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal. No entanto, há registros populares (comunicações pessoais) do uso da seiva por gestantes.

Diante do exposto e considerando que a seiva pode ser consumida por gestantes, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da seiva de *D. alata* (SDa) no desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal em camundongos Swiss.

2. Material e métodos

2.1. Material botânico e extração

A seiva bruta de *D. alata* foi coletada em julho de 2018 no município de Terenos-MS, Brasil, na Fazenda Riqueza, situada na estrada Terenos-Alonso Km 32 (20°, 17'01" S 54° 59' 23,88" W). A espécie coletada foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o número 69846 CGMS. A planta foi cadastrada no Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Genéticos e conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen # A7716EC). Para a retirada da seiva do xilema do tronco da *D. alata*, foi utilizada uma broca de aço (0,50 m de comprimento x 0,015 m de diâmetro) para fazer uma perfuração a $1,4 \pm 0,2$ metros de altura. Após a perfuração inseriu-se uma mangueira para a coleta da seiva em um recipiente estéril. Coletou-se 200 ml de seiva de cada árvore. Ao final foi realizado um *pool* de todas as seivas para a obtenção de uma amostra (Rosa et al., 2022).

Para administração da seiva aos animais, essa foi diluída na proporção de 3 partes de água para 1 parte de seiva (3:1 – 25%); 2 partes de água para 2 partes de seiva (2:2 – 50%); e 1 parte de água para 3 partes de seiva (1:3 – 75%).

2.2 Animais

Foram utilizados 60 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, sendo 40 fêmeas e 20 machos, em idade reprodutiva (8-10 semanas). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais foram ambientados para adaptação durante um período de 7 dias em mini-isoladores de polisulfona, cobertos com maravalha de pinus, em rack ventilada Alesco® (AL21) e mantidos em temperatura controlada 22 ± 2 °C com ciclo claro/escuro de 12 h, umidade de $55 \pm 10\%$ e livre acesso a água filtrada e ração comercial (Nuvital®). A pesquisa foi realizada de acordo com os protocolos da Declaração Universal dos Direitos Animais e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o parecer # 1.328/2024.

2.3 Delineamento Experimental

Os animais foram acasalados *overnight* na proporção de 2 fêmeas: 1 macho. A detecção da prenhez foi realizada por meio da observação do *plug* vaginal, sendo este considerado o dia zero de gestação (Oliveira et al., 2009; Gonçalves et al., 2013; David et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Ishikawa et al., 2018; Vani et al., 2018). As fêmeas prenhes foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos experimentais (n=10): Grupo Controle – os animais receberam o veículo (água destilada) na proporção de 0,1 ml/10 g de peso corporal (p.c.) por via oral (gavagem; v.o.), do 1º ao 18º dia de gestação (d.g.); Grupo Seiva de *D. alata* (SDa) - os animais foram tratados na proporção de 0,1mL/10 g (p.c.; v.o.) com SDa nas proporções de 25% (SDa25), 50% (SDa50) e 75% (SDa75) do 1º ao 18º d.g..

2.4. Ensaios biológicos

No 18º d.g. os animais foram submetidos à eutanásia, por deslocamento cervical, seguida de laparotomia, histerectomia, onfalectomia e toracotomia para a coleta, pesagem e devido armazenamento dos órgãos (pulmão, coração, baço, fígado, rins, placenta) e fetos.

Imediatamente após a laparotomia, os fetos foram submetidos à eutanásia com overdose de Isoflurano utilizando sistema automático de anestesia inalatória (Bonther®). A liberação do Isoflurano foi realizada automaticamente pelo aparelho e a saturação de anestésico utilizada foi de 10%. A infusão de Isoflurano foi continuada até um minuto após o feto cessar os movimentos respiratórios (AVMA, 2020; Neves et al., 2024).

Os fetos coletados foram pesados e passaram por análise sistemática de malformações externas e sexagem. Em seguida, foram distribuídos aleatoriamente em dois subgrupos, cada um com aproximadamente 50% da ninhada. Os fetos do primeiro subgrupo foram fixados em acetona absoluta, por pelo menos sete dias, e destinados à análise esquelética pela técnica descrita por Staples e Schnell (1964) e modificada por Oliveira et al. (2009). Após a fixação os fetos foram eviscerados e mergulhados em solução de KOH (0,8%) para o processo de diafanização. Em seguida, foram adicionadas quatro

gotas de *Alizarina Red*. Esta solução foi trocada a cada 24 horas durante quatro dias consecutivos. Depois dos fetos corados, a solução de KOH foi substituída pela solução clareadora (1 litro de glicerina: 1 litro de álcool etílico: 0,5 litros de álcool benzílico) e trocada a cada 24 horas, durante cinco dias consecutivos. As malformações foram classificadas com base nos estudos de Taylor (1986), Manson et al. (1994), Wise et al. (1997), Damasceno et al. (2008) e Oliveira et al. (2009). Os fetos do segundo subgrupo foram fixados em uma solução de Bodian's (água destilada (142 mL), ácido acético (50 mL), formaldeído (50 mL) e álcool 95% (758 mL) por pelo menos sete dias e destinados à análise visceral (Nunes et al., 2023; Ortiz et al., 2023, Rezende et., 2023) por meio de microdissecção com cortes estratégicos, para o estudo de tórax e abdômen, propostos por Barrow e Taylor (1969), e para estudo da cabeça segundo Wilson (1965), com alterações propostas por Oliveira et al. (2005), Damasceno et al. (2008) e Oliveira et al. (2009). A classificação das alterações viscerais foi baseada nos trabalhos de Taylor (1986), Manson e Kang (1994), Wise et al. (1997), Damasceno et al. (2008) e Oliveira et al. (2009).

As análises de vísceras e esqueletos fetais foram realizadas em lupa estereomicroscópica (Nikon® – SMZ 745T) com aumento de 4 vezes.

2.5. Parâmetros biométricos

Os parâmetros biométricos foram compostos e/ou calculados conforme os dados do peso inicial (fêmeas pesadas no dia zero), peso final (fêmeas pesadas no 18º d.g.), ganho de peso (peso final - peso inicial), peso do útero e ganho de peso líquido (ganho de peso - peso do útero), além dos dados de pesos absolutos e relativos (peso do órgão /peso final do animal) do coração, pulmão, baço, rins e fígado.

2.6. Desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal

Foram quantificados e/ou calculados os parâmetros reprodutivos relativos ao número de implantes (nº de fetos vivos + nº de fetos mortos + nº de reabsorções); número de fetos vivos; viabilidade fetal ($\text{nº de fetos vivos} \times 100 / \text{nº de implantes}$); taxa de perdas

pós-implantacionais ((nº de implantes - nº de fetos vivos) *100 / nº de implantes); número de reabsorção; taxa de reabsorção (nº de reabsorções *100 / nº de implantes); peso placentário; peso fetal; índice placentário (peso placentário / peso fetal); eficiência placentária (peso fetal / peso placentário); e razão sexual (número de fetos machos *100 / número de fetos fêmeas).

A classificação do peso fetal segundo a idade gestacional (CPFIG) foi feita de duas formas: (I) segundo Soulimane-Mokhtari et al. (2005) - os fetos foram considerados adequados para a idade gestacional (AIG) quando não divergiram mais que $\pm 1,7 \times$ desvio padrão (DP) da média dos fetos do controle; considerados pequenos para a idade gestacional (PIG) quando apresentaram peso corporal menor que $- 1,7 \times$ desvio padrão em relação à média dos fetos do grupo controle; e considerados grandes para a idade gestacional (GIG) quando apresentaram peso corporal maior que $+ 1,7 \times$ desvio padrão em relação à média do grupo controle; e (II) segundo Oliveira et al. (2009) - os fetos foram classificados como fetos com peso adequado para a idade da prenhez (PAIP) quando o peso do feto estava compreendido entre média de peso dos fetos do grupo controle mais ou menos o desvio padrão; fetos com baixo peso para a idade de prenhez (BPIP) quando o peso do feto é inferior à média de peso dos fetos do grupo controle menos o desvio padrão deste mesmo grupo; e fetos com elevado peso para a idade de prenhez (EPIP) quando o peso do feto é superior à média do peso dos fetos do grupo controle mais o desvio padrão deste mesmo grupo. Soulimane-Mokhtari et al. (2005) classifica o peso dos fetos individualmente e Oliveira et al. (2009) classifica a ninhada de forma geral.

2.7 Análise estatística

Foi utilizado o teste ANOVA/Tukey para dados paramétricos, Kruskal-Wallis/Dunn para dados não paramétricos e o teste do Qui-quadrado para comparações de frequências entre os grupos. Os dados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média ou média $\pm$ desvio padrão e o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Parâmetros Biométricos

A avaliação dos parâmetros biométricos demonstrou que o peso inicial, peso final, ganho de peso, peso do útero, ganho de peso líquido (Figura 1A), peso absoluto do baço (Figura 1B), e o peso relativo do coração e do baço (Figura 1C) não apresentaram diferenças ($p>0,05$) entre os grupos experimentais. No entanto, o peso absoluto do coração, do pulmão, do fígado e dos rins (Figura 1B), e o peso relativo do pulmão, do fígado e dos rins (Figura 1C) aumentaram ($p<0,05$) em relação ao grupo controle.

3.2 Desempenho Reprodutivo

A avaliação do desempenho reprodutivo demonstrou que o número de fêmeas prenhes, número de implantes, número de fetos vivos, número de fetos mortos, número de reabsorção, taxa de reabsorção, taxa de perdas pós-implantacionais, viabilidade fetal e razão sexual não apresentaram diferenças ($p>0,05$) entre os grupos experimentais (Tabela 1).

3.3 Desenvolvimento embriofetal

A avaliação do desenvolvimento embriofetal demonstrou que a maior concentração de SDA (75%) aumentou ($p<0,05$) o peso fetal, o peso placentário e o índice placentário. Essa mesma dose reduziu ($p<0,05$) a eficiência placentária. Para as demais doses nenhuma alteração foi evidenciada em relação ao grupo controle (Tabela 2).

A adequação do peso à idade gestacional, de acordo com Souliname-Mokhtari et al. (2005), demonstrou que não há diferenças ($p>0,05$) para a frequência fetos PIG, AIG e GIG entre os grupos experimentais. Destaca-se ainda que a frequência de fetos PIG variou de 1,60 a 6,9%, a de AIG de 87,93 a 97,78% e a de GIG de 0,92 a 5,17% entre os grupos experimentais. Já a análise da ninhada, segundo Oliveira et al. (2009), demonstrou que todas as ninhadas possuíam peso adequando para a idade gestacional ($p>0,05$) (Tabela 2).

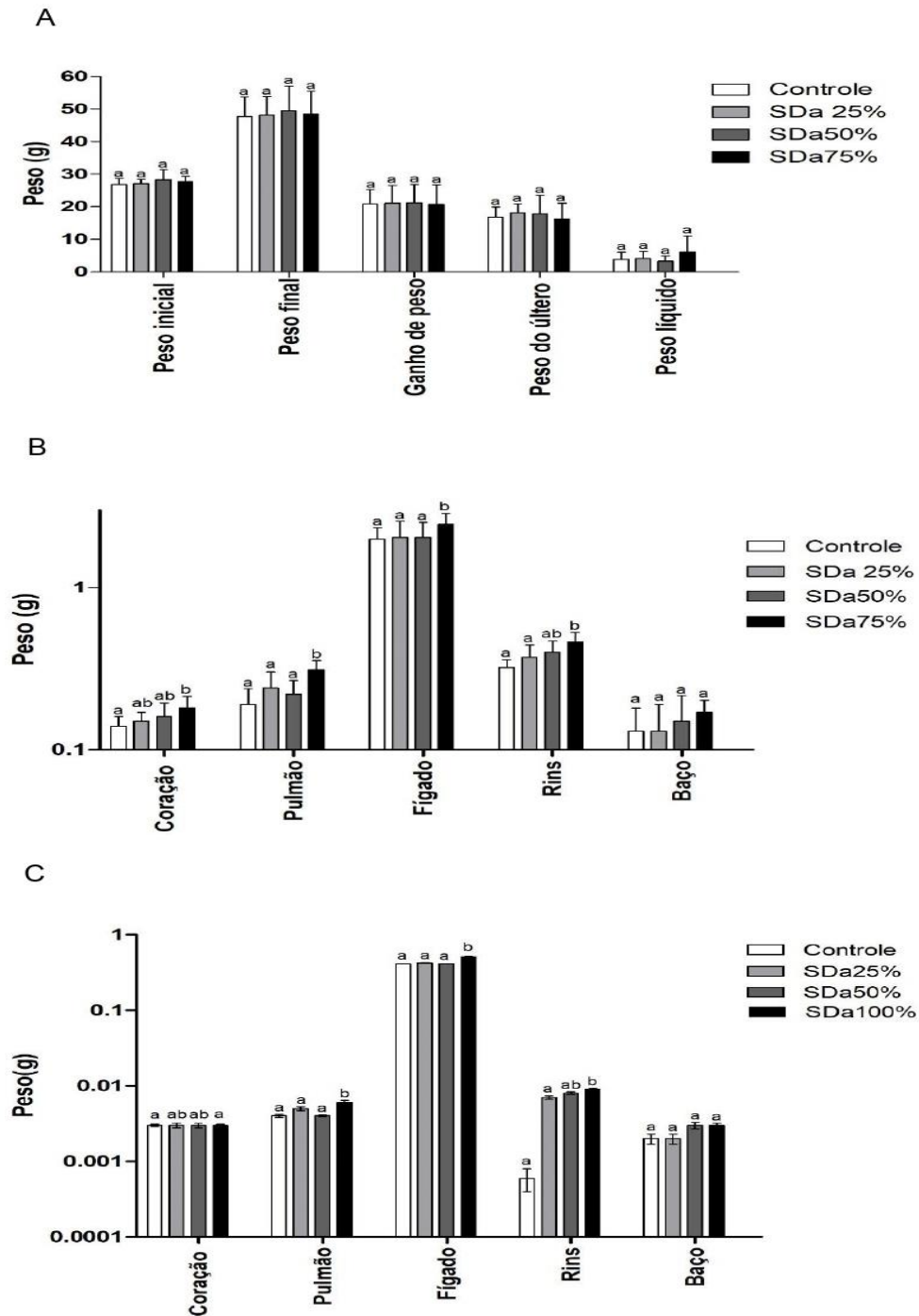


Figura 1- A) - Média $\pm$ Desvio padrão da média do peso inicial, peso final, ganho de peso, peso do útero e ganho de peso líquido. B) - Média $\pm$ Desvio Padrão do peso absoluto dos órgãos. C) - Média $\pm$ Desvio Padrão do peso relativo dos órgãos. SDa - Seiva de *D. alata* nas proporções de 25 (SDa25), 50 (SDa50) e 75% (SDa75). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Teste estatístico: ANOVA/Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 1. Valores médios $\pm$ erro padrão da média dos parâmetros relativos ao desempenho reprodutivo das fêmeas tratadas com a seiva de *D. alata* (SDa).

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	SDa25	SDa50	SDa100
N° fêmeas				
Prenhe	10	10	10	10
Implantes	12,9 $\pm$ 0,86 ^a	13,4 $\pm$ 0,74 ^a	12,3 $\pm$ 1,24 ^a	12 $\pm$ 1,00 ^a
Fetos Vivos	11,5 $\pm$ 0,56 ^a	12,6 $\pm$ 0,76 ^a	11,7 $\pm$ 1,19 ^a	10,9 $\pm$ 1,03 ^a
Fetos Mortos	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	0,3 $\pm$ 0,15 ^a	0,2 $\pm$ 0,20 ^a	0,1 $\pm$ 0,10 ^a
Reabsorção	1,4 $\pm$ 0,42 ^a	0,5 $\pm$ 0,22 ^a	0,4 $\pm$ 0,16 ^a	1 $\pm$ 0,29 ^a
TR	9,52 $\pm$ 2,85 ^a	3,93 $\pm$ 1,74 ^a	3,01 $\pm$ 1,25 ^a	9,18 $\pm$ 2,53 ^a
TPPI	9,5 $\pm$ 2,85 ^a	5,92 $\pm$ 2,23 ^a	4,44 $\pm$ 1,62 ^a	9,90 $\pm$ 2,57 ^a
Viabilidade Fetal	100,00 $\pm$ 0,00 ^a	95,73 $\pm$ 2,23 ^a	97,14 $\pm$ 2,85 ^a	98,46 $\pm$ 1,53 ^a
Razão Sexual	1,67 $\pm$ 0,63 ^a	0,85 $\pm$ 0,09 ^a	0,87 $\pm$ 0,23 ^a	1,51 $\pm$ 0,31 ^a

Legenda: TR – Taxa de reabsorção; TPPI – Taxa de perdas pós-implantacionais. Seiva de *D. alata* nas proporções de 25 (SDa25), 50 (SDa50) e 75% (SDa75). Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: Anova/Tukey; $p < 0,05$).

Tabela 2. Valores médios $\pm$ erro padrão da média dos parâmetros relativos ao desenvolvimento embriofetal das fêmeas tratadas com a seiva de *D. alata* (SDa) e frequência (porcentagem) dos fetos distribuídos de acordo com a adequação do peso gestacional.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	SDa25	SDa 50	SDa 75
Peso Fetal ¹	1,21 $\pm$ 0,01 ^a	1,20 $\pm$ 0,01 ^a	1,21 $\pm$ 0,01 ^a	1,29 $\pm$ 0,01 ^b
Peso da Placenta ¹	0,07 $\pm$ 0,001 ^a	0,08 $\pm$ 0,006 ^a	0,07 $\pm$ 0,001 ^a	0,08 $\pm$ 0,001 ^b
Índice Placentário ¹	0,06 $\pm$ 0,001 ^a	0,06 $\pm$ 0,004 ^a	0,06 $\pm$ 0,001 ^a	0,07 $\pm$ 0,001 ^b
Eficiência Placentária ¹	17,63 $\pm$ 0,97 ^a	17,67 $\pm$ 0,78 ^a	18,10 $\pm$ 0,44 ^a	14,97 $\pm$ 0,29 ^b
CFIG ²				
PIG ^{2,3}	1,74%	1,60%	6,90%	4,59%
AIG ^{2,3}	94,78%	91,20%	87,93%	94,50%
GIG ^{2,3}	3,48%	7,20%	5,17%	0,92%
APIG ^{3,4}	PAIP	PAIP	PAIP	PAIP

Legenda: Seiva de *D. alata* (SDa) nas proporções de 25 (SDa25), 50 (SDa50) e 75% (SDa75). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: ¹Anova/ Tukey $p < 0,05$). ²CFIG - Classificação do feto de acordo com a idade gestacional segundo Soulimane-Mokhtari et al. (2005): PIG – pequeno para idade gestacional; AIG; adequado para idade gestacional; GIG – grande para idade gestacional (³Teste Estatístico: Qui-quadrado; $p > 0,05$). ⁴APIG - Adequação do Peso à Idade Gestacional – Classificação da ninhada de acordo com Oliveira et al. (2009): PAIP – Peso adequado para a idade gestacional (³Teste Estatístico: Qui-quadrado; $p > 0,05$).

A avaliação das malformações externas demonstrou a presença de hiperextensão e hiperflexão de membros, pata espalmada, pata torta, retroversão de pata, pata pequena e cauda dobrada (Figura 2). A análise estatística demonstrou aumento da frequência de hiperextensão de membro em todos os grupos tratados com a SDa. Uma análise global das malformações externas demonstrou aumento ($p < 0,05$) de defeitos congênitos na maior dose de SDa (Tabela 3).

Tabela 3. Números absolutos e porcentagem de malformações externas encontradas na prole de fêmeas tratadas com a seiva de *D. alata* (SDa).

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	SDa 25	SDa 50	SDa 75
Análise Externa				
Fetos Analisados	114	125	116	109
Fetos Normais	95	98	87	57*
%	83,33	78,40	75,00	52,29
Hiperextensão de membros	4	14*	21*	44*
%	3,51	11,20	18,10	40,37
Hiperflexão de membros	0	1	4	5
%	0,00	0,80	3,45	4,59
Pata espalmada	1	1	2	0
%	0,88	0,80	1,72	0,00
Pata torta	4	0	0	1
%	3,51	0,00	0,00	0,92
Retroversão de pata	8	10	3	7
%	7,02	8,00	2,59	6,42
Pata pequena	1	1	0	0
%	0,88	0,80	0,00	0,00
Cauda dobrada	1	3	2	3
%	0,88	2,40	1,72	2,75
Frequência de malformação externa	19	30	32	60*
% malformação externa	16,67	24,00	27,59	55,05

Legenda: % - Porcentagem de fetos com malformações. Seiva de *D. alata* (SDa) nas proporções de 25, 50 e 75 %. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle (Teste Estatístico: Qui-quadrado; $p < 0,05$).

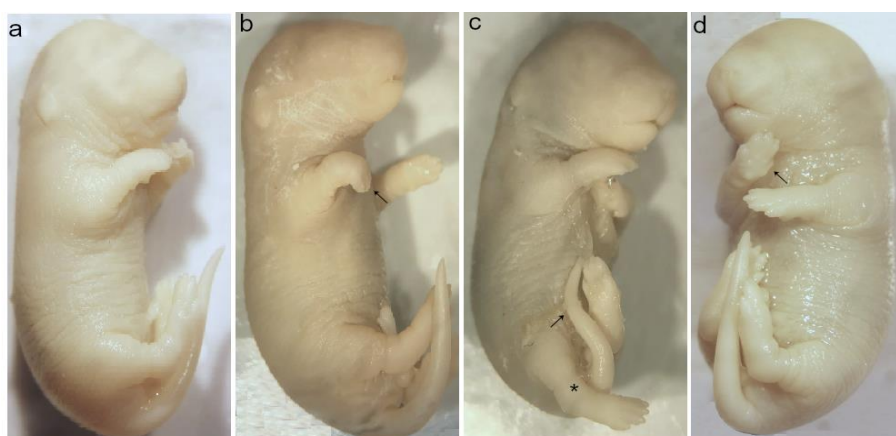


Figura 2- Exemplo de malformações externas: a - feto normal, b - retroversão de pata (→), c - hiperextensão (*) de pata e cauda torta (→), d - pata com aspecto espalmado (→).

A avaliação de malformações viscerais demonstrou a presença de hidrocefalia de graus leve e moderado (Figura 3). A maior frequência foi observada no grupo controle e o tratamento com todas as doses de SDa reduziram ($p < 0,05$) a ocorrência dessa alteração. A avaliação global também demonstrou redução ($p < 0,05$) da frequência de malformações quando as fêmeas foram tratadas com SDa (Tabela 4).

Tabela 4. Números absolutos e porcentagem de malformações viscerais encontradas na prole de fêmeas tratadas com a seiva de *D. alata* (SDa).

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	SDa 25	SDa 50	SDa 75
Análise Visceral				
Fetos Analisados	57	65	59	57
Fetos Normais	32	62	59	54
%	56,14	95,38	100,00	94,74
Hidrocefalia leve	5	0*	0*	1*
%	8,77	0,00	0,00	1,75
Hidrocefalia moderada	20	3*	0*	2*
%	35,09	4,62	0,00	3,51
Frequência de malformação visceral	25	3*	0*	3*
% malformação visceral	43,86	4,62	0,00	5,26

Legenda: % - Porcentagem de fetos com malformações. Seiva de *D. alata* (SDa) nas proporções de 25,50 e 75%. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle (Teste Estatístico: Quiquadrado; $p < 0,05$).



Figura 3 - Microdissecção demonstrando hidrocefalia (exemplo de malformações viscerais): a - aspecto do cérebro normal, b - hidrocefalia leve, c - hidrocefalia moderada.

A avaliação de malformações esqueléticas demonstrou a ocorrência de anormalidades do esternóbrio (esternóbrios anormais – quando todos os esternóbrios possuíam formato irregular, esternóbrio com ossificação incompleta nos centros esternais, esternóbrio com ossificação reduzida, agenesia de esternóbrio centros esternais) escoliose, hipercifose, inversão da cifose torácica, ossificação reduzida do parietal e interparietal, centro cervical anormal (anteriorização da cabeça), agenesia de falange e ossificação incompleta de falanges. A análise estatística demonstrou que a maior dose de SDa aumentou ($p < 0,05$) a frequência de escoliose. No entanto, em uma avaliação global das malformações esqueléticas a menor dose de SDa aumentou ($p < 0,05$) a frequência total de malformações (Tabela 5).

Tabela 5. Números absolutos e porcentagem de malformações esqueléticas encontradas na prole de fêmeas tratadas com a seiva de *D. alata* (SDa)

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	SDa 25	SDa 50	SDa 75
Análise Esquelética				
Fetos Analisados	57	59	53	50
Fetos Normais	47	36	39	33
%	82,46	62,71	73,58	66,00
Cabeça				
OR Parietal	0	0	1	0
%			1,89	
OR Interparietal	0	0	1	0
%			1,36	
Tronco				
Esternóbrios anormais (formato irregular)	1	4	1	2
%	1,75	6,78	1,89	4,00
Esternóbrio com ossificação incompleta	5	5	4	0

%	8,77	8,47	7,54	0
OR Esternébrio	0	1	0	0
%	0	1,69	0,00	0
Agnesia de Esternébrio	0	1	0	0
%	0	1,69	0	0
Hipercifose	0	2	3	1
%	0	3,39	5,66	2,00
Escoliose	4	9	3	15*
%	7,02	15,25	5,66	30,00
Centro cervical anormal	0	0	1	0
%			1,36	
Membros				
Agnesia de falange	0	0	1	0
%	0	0,00	1,89	0,00
Ossificação incompleta de falanges	0	0,00	1	0,00
%			1,36	
Frequência de malformação esquelética	10	23*	16	18
%	17,54	38,98	30,19	36

Legenda: % - Porcentagem de fetos com malformações. Seiva de *D. alata* (SDa) nas proporções de 25,50 e 75 %. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle (Teste Estatístico: Qui-quadrado; $p < 0,05$).

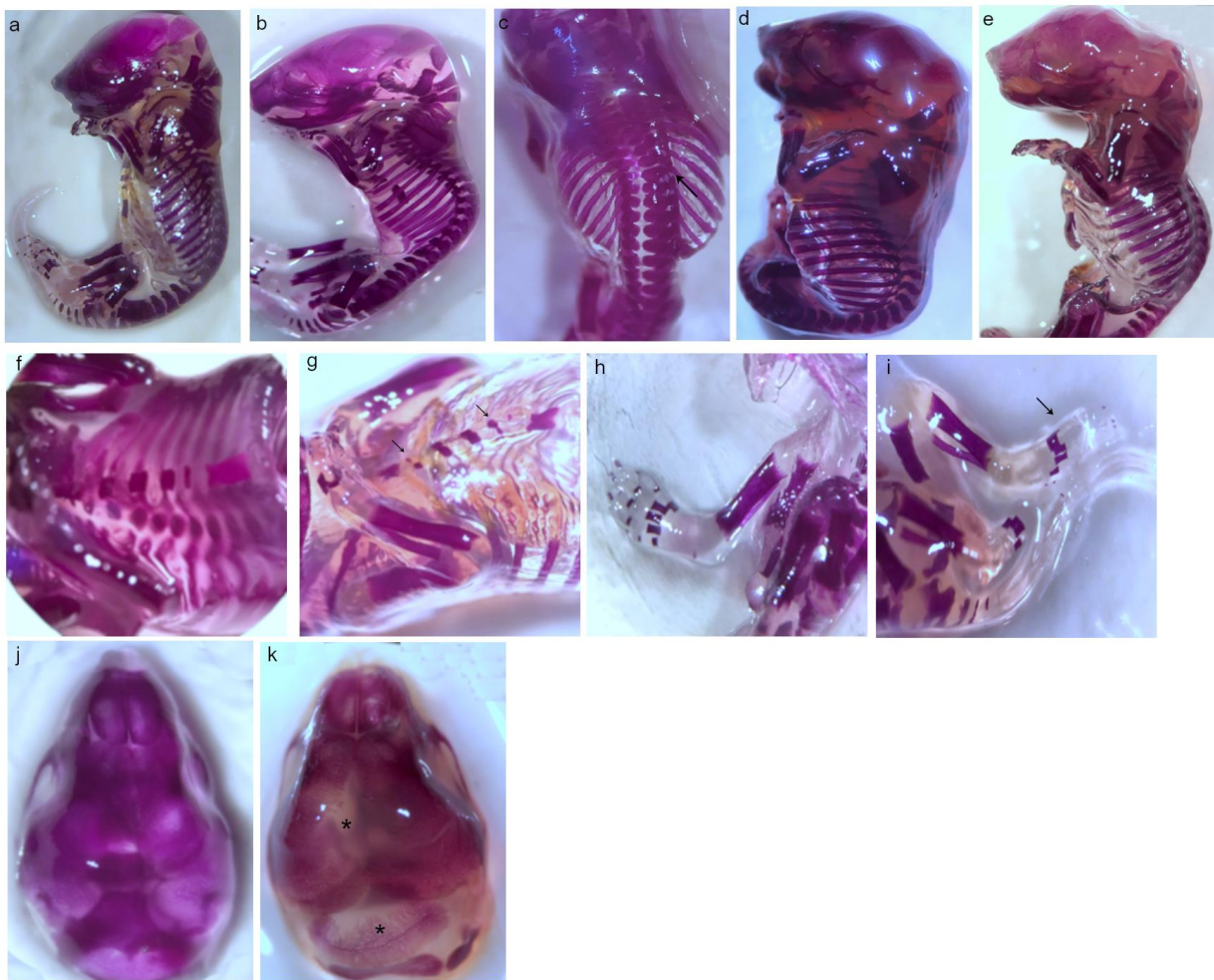


Figura 4 - Exemplo de malformações esquelética: a – aspecto do feto normal, b - escoliose, c - hipercifose, d - inversão da cifose torácica, e – anteriorização da cabeça, f- esternóbrio sem alteração, g - esternóbrio anormal e ossificação incompleta dos centros esternais, h - falanges sem alteração. i - agnesia e ossificação reduzida de falanges, j - ossos da cabeça sem alteração; k - ossificação reduzida dos ossos da cabeça, parietal e interparietal.

Discussão

Nosso estudo não identificou sinais de toxicidade nas fêmeas tratadas. Diarréia, tremores, salivação excessiva, convulsões, hipoatividade, ataxia, letargia, arqueamento da cauda, pelos eriçados, diminuição do consumo de água e comida, e perda de peso são sinais clássicos de toxicidade (Christian, 2007; Corso *et al.*, 2019). No entanto, observou-se aumento no peso absoluto do coração, do pulmão, do fígado e dos rins, e do peso relativo do pulmão, do fígado e dos rins. Esses resultados requerem mais atenção em estudos futuros. Em geral, a perda de peso é um indicativo de toxicidade (Morissey *et al.*, 1990; Ait Atmane *et al.*, 2022) e em muitas vezes essa perda de peso está associada à redução do peso dos órgãos (Ramesh *et al.*, 2007). No presente estudo isso não foi verificado porque na realidade o peso absoluto e relativo do pulmão, fígado e rins aumentaram. No entanto, esse fato não é incomum na literatura e já foi relatado o aumento de peso de órgãos em animais tratados com produtos naturais tais como *Strychnos pseudoquina* (Souza *et al.*, 2023), *Phyllanthus niruri* L (Paula *et al.*, 2020) e *Croton urucurana* (Moraes *et al.*, 2017). Nesses casos o aumento do peso associou-se à sinais de toxicidade. Destaca-se ainda que quando a alteração se dá no peso absoluto e depois não se confirma no peso relativo pode-se sugerir que a diferença se devia ao tamanho do animal e não ao efeito do tratamento (Nunes *et al.*, 2023). Assim, o dado isolado do peso absoluto não se configura como um sinal de toxicidade. Porém, quando a diferença se mantém no peso relativo trata-se de um sinal de alerta e que sugere toxicidade.

A SDa não alterou o desempenho reprodutivo porque não houve alteração no número fêmeas prenhes, número de implantes, número de fetos vivos, número de fetos mortos, número de reabsorção, taxa de reabsorção, taxa de perdas pós-implantacionais, viabilidade fetal e razão sexual. Esses parâmetros são aqueles considerados pela literatura especializada como capazes de identificar possíveis alterações no desempenho reprodutivo de fêmeas (ElMazoudy; Attia, 2018; Ishikawa *et al.*, 2018; Salustriano *et al.*, 2022; Nunes *et al.*, 2023; Ortiz *et al.*, 2023; Rezende *et al.*, 2023). Como nenhum parâmetro foi alterado é possível inferir segurança reprodutiva para o consumo da SDa durante o período gestacional de acordo com esse delineamento experimental.

Apesar de não ter alterado o desempenho reprodutivo, a SDa alterou o desenvolvimento embriofetal. Um dos fatos que chamou a atenção foi o aumento do peso dos fetos no grupo tratado com a maior dose de SDa. Nesse mesmo grupo observou-se o aumento do peso placentário e do índice placentário. Esses dois fatos justificam o aumento do peso fetal porque com o aumento da placenta e do índice placentário ocorre um maior aporte sanguíneo da mãe para o feto (Fowden *et al.*, 2009) e, por consequência, ocorre aumento do transporte de nutrientes e oxigênio (Akison *et al.*, 2017). Esses favorecem um maior desenvolvimento e/ou crescimento do feto (Wilson, 1999). Para que isso ocorre é esperado que ocorra também o aumento da eficiência placentária. No entanto, isso não foi observado no presente estudo, ou seja, verificou-se a redução da eficiência placentária. Apesar desse achado inesperado não é incomum essa descrição na literatura. De acordo com Paula *et al.* (2020), pode ocorrer o aumento do peso fetal mesmo na ausência de aumento da eficiência placentária.

Apesar do aumento do peso fetal, das fêmeas tratadas com a maior dose de SDa, a análise estatística não indicou diferenças nas frequências de fetos GIG entre os grupos segundo a metodologia de Souliname-Mokhtari *et al.* (2005). A frequência de fetos GIG para o grupo controle foi de 94,78 e para as fêmeas tratadas com a maior dose de SDa foi de 95,50. Esse fato sugere que o aumento do peso, apesar de significativo, não induziu o nascimento de fetos macrossômicos. Reforça esse fato, o achado de que as ninhadas foram classificadas com o peso adequado para a idade gestacional segundo a metodologia de Oliveira *et al.* (2009). A literatura consultada não é uníssona na possibilidade de produtos naturais induzir o nascimento de fetos macrossômicos. Fêmeas tratadas com produtos naturais tais como *Morinda citrifolia* (Leal-silva *et al.*, 2022), *Salvia lachnostachys* Benth (Ortiz *et al.*, 2023), *Curatella americana* (Cruz *et al.*, 2022), *Gomphrena celosioides* Mart (Salustriano *et al.*, 2022) e *Salvia lachnostachys* Benth (Ortiz *et al.*, 2023), por exemplo, não induziram aumento do peso fetal. Porém, o estudo desenvolvido por Paula *et al.* (2020) registrou que *Phyllanthus niruri*, administrada em ratas prenhes, causou macrossomia (aumento do peso fetal que determinou fetos grandes para a idade gestacional) e aumento dos sítios de ossificação. A macrossomia fetal pode associar-se ao surgimento tardio de

outras doenças como obesidade, diabetes e dislipidemias (Plagemann, 2005; Hull *et al.*, 2008; Moussa *et al.*, 2016).

Ainda dentre as alterações do desenvolvimento embriofetal destaca-se que SDA aumentou a frequência global de malformações externas na maior dose. Além disso, quando as malformações foram analisadas individualmente ocorreu aumento de hiperextensão de membro para todas as doses analisadas. Esses dados para *D. alata* são discordantes com a literatura. Segundo Esteves-Pedro *et al.* (2012), o extrato aquoso de *D. alata* não interfere na capacidade reprodutiva, no desenvolvimento físico dos filhotes de ratos e nos ensaios de desenvolvimento neurocomportamental. Esses autores ainda descrevem em sua metodologia que foram realizadas as avaliações de malformações externas, viscerais e esqueléticas. No entanto, o artigo não apresentou esses resultados de forma clara o que impede uma análise mais criteriosa para essa discussão. No entanto, é notória a diferença de resultados. Esse fato pode ter ocorrido por dois motivos principais: (I) o presente trabalho usou como modelo camundongos Swiss e Esteves-Pedro *et al.* (2011) usou ratos Wistar. Além disso, o presente estudo utiliza a seiva para o tratamento enquanto que Esteves-Pedro *et al.* (2011) utilizou o extrato aquoso das cascas de *D. alata*.

Em relação às malformações viscerais observou-se maior frequência de hidrocefalia (leve e moderada) no grupo controle. Esse fato pode ser justificado uma vez que hidrocefalias podem ser consideradas variantes da normalidade (Taylor, 1986; Gonçalves *et al.*, 2013; De-David *et al.*, 2014; Vani *et al.*, 2018; Ishikawa *et al.*, 2018; Salustriano *et al.*, 2022; Nunes *et al.*, 2023; Ortiz *et al.*, 2023; Neves *et al.*, 2024) visto que os fetos foram coletados no 18º d.g. e o nascimento a termo seria no 21-22º d.g (Ishikawa *et al.*, 2018; Vani *et al.*, 2018; Salustriano *et al.*, 2022; Nunes *et al.*, 2023; Ortiz *et al.*, 2023). Essa coleta de fetos precocemente impede o final do desenvolvimento do feto e isso inclui o final do desenvolvimento/maturação do sistema nervoso (Nunes *et al.*, 2023). O sistema nervoso é um dos primeiros sistemas que começam a se desenvolver. A neurulação, na embriogênese, inicia-se por volta do 8,5 dia embrionário e é um dos últimos a terminar a maturação que na realidade termina após o nascimento (Copp; Greene; Murdoch, 2003; Brust; Lewejohann., 2015). Assim, esses 3-4 dias de antecipação podem causar esse tipo de variante da normalidade. Outros estudos da literatura demonstraram frequência de

hidrocefalias em grupo controles que variaram de 4,35% (Ishikawa *et al.*, 2018) a 58,60% (Salustriano *et al.*, 2023). Além disso, outros estudos demonstram porcentagens intermediárias (Ishikawa *et al.*, 2018; Vani *et al.*, 2018; Salustriano *et al.*, 2022; Nunes *et al.*, 2023; Ortiz *et al.*, 2023; Rezende *et al.*, 2023). Essas variações de frequência de hidrocefalias foram baseadas somente em dados desse grupo de pesquisa devido ter usado o mesmo modelo experimental, a mesma colônia de animais e também o mesmo método de análise. Assim, é possível obter dados comparativos com mais acurácia visto que os parâmetros foram obtidos em condições muito semelhantes.

Outro fato que chamou a atenção é que o tratamento com a SDa reduziu a frequência de hidrocefalias em todas as doses testadas. Esse fato sugere efeito neuroprotetor. A literatura já evidenciou o efeito do extrato e derivados de *D. alata* no sistema nervoso. De acordo com a literatura, o extrato da casca (Nazato *et al.*, 2010) e frações (Puebla *et al.*, 2010) de *D. alata* bem como uma isoflavona (7,8,3'-trihidroxi-4'-metoxiisoflavona) (Ferraz *et al.*, 2014), extraída de *D. alata*, foram capazes de neutralizar os efeitos neurotóxicos e miotóxicos induzidos pelo veneno de *Bothrops jararacuçu* (Jararacuçu). Outro fato que indica ausência de alterações neurais é que o extrato aquoso de *D. alata* não alterou o desenvolvimento neurocomportamental (ensaio de campo aberto) de recém-nascidos de mães expostas a essa planta (Esteves-Pedro *et al.*, 2012).

Em relação às malformações esqueléticas, observou aumento da frequência somente para a menor dose em uma análise global. A frequência total de malformações esqueléticas para esse grupo foi de 38,98%. Apesar de haver diferença significativa em relação ao grupo controle esse valor não é alto em relação a outros estudos realizados pelo mesmo grupo. Logo, em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa a frequência global de malformações esqueléticas, para os grupos controles, variaram de 3,45% (Rezende *et al.*, 2023) a 88,89% (Salustriano *et al.*, 2022) dentre outras porcentagens observadas (Ishikawa *et al.*, 2018; Vani *et al.*, 2018; Ortiz *et al.*, 2023; Nunes *et al.*, 2023; Neves *et al.*, 2024). Assim, é possível inferir que a frequência observada para a menor dose de SDa não tem relevância biológica se considerada isoladamente. Além disso, o processo de não ossificação de ossos pequenos e de extremidades como é o caso das falanges podem ser consideradas variantes da normalidade (Kimmel, 1973; Tyl, Chernoff, Rogers,

2007; Gonçalves *et al.*, 2013; David *et al.*, 2014; Salustriano *et al.*, 2022; Nunes *et al.*, 2023; Ortiz *et al.*, 2023; Neves *et al.*, 2024). Esse fato pode ter ocorrido porque os fetos foram coletados no 18º d.g. gestacional e não no 21-22 d.g. quando o parto aconteceria a termo (Oliveira *et al.*, 2015) outro fato que chama atenção é que esse processo de ossificação poderia acontecer e/ou finalizar após o nascimento sem causar prejuízos para os fetos (Salustriano *et al.*, 2022). Assim, malformações que podem ser consideradas variantes da normalidade podem ser consideradas malformações menores. As malformações maiores seriam graves alterações anatômicas, estéticas e funcionais podendo levar à morte, enquanto as menores levam a fenótipos que se diferenciam dos normais. No entanto, sem causar alterações significativas para a vida diária ou levar à morte (Rodrigues *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2021).

Frente ao exposto, considera-se que a SDa tem baixo potencial maternotóxico, não alterou o desempenho reprodutivo de fêmeas e tem baixo potencial teratogênico. No entanto, o seu uso não é recomendado no período gestacional devido, em especial, ao aumento de malformações externas.

REFERÊNCIAS

AIT ATMANE, S. *et al.* Acute and 28-day repeated dose toxicity evaluations of cold pressed *Pinus halepensis* Mill. seed oil in mice and rats. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 132, n. 105191, p. 105191, 2022.

AKISON, L. K. *et al.* Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. **Placenta**, v. 54, p. 52–58, 2017.

ALVES-SANTOS, ALINE MEDEIROS *et al.* Chemical composition and prebiotic activity of baru (*Dipteryx alata* Vog.) pulp on probiotic strains and human colonic microbiota. **Food Research International**, v. 164, p. 112366, 1 fev. 2023.

ALVES-SANTOS, ALINE M. *et al.* Baru (*Dipteryx alata* Vog.) agro-industrial by-products promote the growth and metabolism of probiotic strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 134, n. 9, p. 1xad206, 5 set. 2023.

BRUST, V.; SCHINDLER, P. M.; LEWEJOHANN, L. Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). **Frontiers in zoology**, v. 12, n. S1, 2015.

CHRISTIAN, M. S. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. **Principles and methods of toxicology**, p. 1301-1381, 2001.

CHAÑI-PAUCAR, L. O. *et al.* A comparative and economic study of the extraction of oil from Baru (*Dipteryx alata*) seeds by supercritical CO₂ with and without mechanical pressing. **Heliyon**, v. 7, n. 1, 1 jan. 2021.

CRUZ, L. L. *et al.* Phytochemical and antidiabetic analysis of *Curatella americana* L. aqueous extract on the rat pregnancy. **Journal of ethnopharmacology**, v. 293, n. 115287, p. 115287, 2022.

COCO, J. C. *et al.* In vitro antioxidant and wound healing properties of baru nut extract (*Dipteryx alata* Vog.) in pulmonary epithelial cells for therapeutic application in chronic pulmonary obstructive disease (COPD). **Natural Product Research**, v. 36, n. 17, p. 4469–4475, 1 set. 2022.

DAVID, N. DE *et al.* *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. **Journal of ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 370–379, 2014.

ELMAZOU DY, R. H.; ATTIA, A. A. Ginger causes subfertility and abortifacient in mice by targeting both estrous cycle and blastocyst implantation without teratogenesis. **Phytomedicine**, v. 50, p. 300–308, 15 nov. 2018.

ESTEVEZ-PEDRO, N. M. *et al.* In vitro and in vivo safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 9, 3 fev. 2012.

FERRAZ, M. C. *et al.* An Isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is Active against the in Vitro Neuromuscular Paralysis of *Bothrops jararacussu* Snake Venom and Bothropstoxin I, and Prevents Venom-Induced Myonecrosis. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5790–5805, 6 maio 2014.

GONÇALVES, C. A. *et al.* Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 843–850, 2013.

HULL, H. R. *et al.* Impact of maternal body mass index on neonate birthweight and body composition. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 198, n. 4, p. 416.e1-416.e6, 2008.

ICCVAM. Peer Review Panel Report: The Use of In Vitro Basal Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing. 2006.

ISHIKAWA, R. B. *et al.* The safe use of *Dolichocarpus dentatus* in the gestational period: Absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 1–6, 10 maio 2018.

LEAL-SILVA, T. *et al.* Toxicological effects of the *Morinda citrifolia* L. fruit extract on maternal reproduction and fetal development in rats. **Drug and chemical toxicology**, v. 46, n. 3, p. 609–615, 2023.

MCILVAIN, G. *et al.* Mapping brain mechanical property maturation from childhood to adulthood. **NeuroImage**, v. 263, n. 119-590, p. 119590, 2022.

MORRISSEY, R. E. *et al.* Overview of reproductive and developmental toxicity studies of 1,3-butadiene in rodents. **Environmental health perspectives**, v. 86, p. 79–84, 1990.

MOUSSA, H. N. *et al.* Obesity epidemic: Impact from preconception to postpartum. **Future science OA**, v. 2, n. 3, 2016.

MC RODRIGUES, G. *et al.* Effects of estrogen-like plant compounds on the vaginal epithelium pituitary, adrenal glands, and uterus of rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 15–16, p. 1173–1184, nov. 2018.

NAZATO, V. S. *et al.* In vitro antiophidian properties of *Dipteryx alata* Vogel bark extracts. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 9, p. 5956–5970, 2010.

NUNES, R. C. S. *et al.* The Ethanolic Extract of *Piper glabratum* Kunth Is Teratogenic and Interferes with the Ossification Process of Swiss Mice Fetuses. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 3, p. 430, 11 mar. 2023

OLIVEIRA, A. K. M. *et al.* Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 283–289, abr. 2011.

OLIVEIRA, R.J., SALLES, M.J.S., SILVA, A.F.D., KANNO, T.Y.N., LOURENÇO, A.C.D.S., FREIRIA, G.A., MATIAZI, H.J., RIBEIRO, L.R., MANTOVANI, M.S. . Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 53, 164–173, 2009. doi:10.1016/j.yrtph.2008.12.007

OLIVEIRA, R.J., OLIVA, S.U., DAROZ, G.A., RUBIO, E.M. Fertility assessment and possible external structural defects on progeny from male rats chronically exposed to arsenic. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, n. 1, p. 57, 2005

OLIVEIRA, R., MANTOVANI, M., PESARINI, J., MAURO, M., SILVA, A.D., SOUZA, T., RIBEIRO, L. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. **Genetics and Molecular Research** v. 14, n. 1, pág. 834-849, 2015

OLIVEIRA, A. K. M. D. *et al.* Effect of frugivory on the germination of cumbaru (*Dipteryx alata*) seeds ingested by tapirs (*Tapirus terrestris*) in the area of Cerrado, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, p. e20211266, 5 dez. 2022.

OLIVEIRA-ALVES, S. C. *et al.* Identification of functional compounds in baru (*Dipteryx alata* Vog.) nuts: Nutritional value, volatile and phenolic composition, antioxidant activity and antiproliferative effect. **Food Research International**, v. 131, p. 109026, 1 maio 2020.

ORTIZ, H. C. *et al.* The ethanolic extract of *Salvia lachnostachys* Benth is not maternotoxic, does not alter reproductive performance, but has teratogenic potential. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, p. 145, 4 maio 2023.

PAULA, V. G. *et al.* Maternal-fetal repercussions of *Phyllanthus niruri* L. treatment during rat pregnancy. **Journal of ethnopharmacology**, v. 254, n. 112728, p. 112728, 2020

PLAGEMANN, A. Perinatal programming and functional teratogenesis: Impact on body weight regulation and obesity. **Physiology & behavior**, v. 86, n. 5, p. 661–668, 2005.

P. MENDES, F. N.; SILVEIRA, E. R. Fatty acids, sesqui- and diterpenoids from seeds of *Dipteryx lacunifera*. **Phytochemistry**, The international journal of plant biochemistry. v. 35, n. 6, p. 1499–1503, 19 abr. 1994.

Queiroz, L.P. 2009. Leguminosas da Caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 443p.

RAMESH, T. *et al.* Acute oral toxicity study of *Asiasari radix* extract in mice. **International journal of toxicology**, v. 26, n. 3, p. 247–251, 2007.

REIS, M. Á. *et al.* Hepatoprotective and Antioxidant Activities of Oil from Baru Almonds (*Dipteryx alata* Vog.) in a Preclinical Model of Lipotoxicity and Dyslipidemia. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. e8376081, 2 out. 2018.

REZENDE, G. C. D. *et al.* Absence of maternal-fetal adverse effects of *Alternanthera littoralis* P. Beauv. following treatment during pregnancy in mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 86, n. 16, p. 543–556, 18 ago. 2023.

SALUSTRIANO, F. R. *et al.* The Ethanolic Extract of *Gomphrena celosioides* Mart. Does Not Alter Reproductive Performance or Embryo-Fetal Development, nor Does It Cause Chromosomal Damage. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 2369, nov. 2022.

SARANDY, M. M. *et al.* Strychnos pseudoquina modulates the morphological reorganization of the scar tissue of second intention cutaneous wounds in rats. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195786, 12 abr. 2018..

SOULIMANE-MOKHTARI, N.A., GUERMOUCHE, B., YESSOUFOU, A., SAKER, M., MOUTAIROU, K., HICHAMI, A., MERZOUK, H., KHAN, N.A. Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. **Clinical Science**. 109, n. 3, p. 287-295, 2005. doi:10.1042/cs20050028

SOUZA, M. R. *et al.* Maternal-fetal toxicity of Strychnos pseudoquina extract treatment during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 311, p. 116459, 15 jul. 2023.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 435–440, jul. 2010.

SOUSA, B. C. M. DE *et al.* Identification of Coumarins and Antimicrobial Potential of Ethanolic Extracts of Dipteryx odorata and Dipteryx punctata. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 5837, 8 set. 2022.

SOUZA, R. G. M. DE *et al.* A baru almond–enriched diet reduces abdominal adiposity and improves high-density lipoprotein concentrations: a randomized, placebo-controlled trial. **Nutrition**, v. 55–56, p. 154–160, 1 nov. 2018.

TAYLOR, P. Practical teratology. London: Academic Press.1986.

VANI, J. M. *et al.* Evaluation of the effects of the larvicides temephos on reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity of Swiss mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 148, p. 22–27, 1 jun. 2018.

VIEIRA JÚNIOR, G. M. *et al.* Terpenos e ácidos graxos de Dipteryx lacunifera Ducke. **Química Nova**, v. 30, p. 1658–1662, 2007.

WILSON, J.G., 1965. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. **Teratology**, 262-277.

WISE, L.D., BECK, S.L., BELTRAME, D., BEYER, B.K., CHAHOUD, I., CLARK, R.L., CLARK, R., DRUGA, A.M., FEUSTON, M.H., GUITTIN, P., HENWOOD, S.M., KIMMEL, C.A., LINDSTROM, P., PALMER, A.K., PETRERE, J.A., SOLOMON, H.M., YASUDA, M., YORK, R.G., 1997. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1). **Teratology**, v. 55, n. 4, p. 249-292, 1997.

ANEXO 2

O extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* tem baixo potencial teratogênico, não altera o desempenho reprodutivo e nem o desenvolvimento embriofetal de camundongos Swiss fêmeas.

Thais Arruda de Santana Biss^{1,2*}, Karuppusamy Arunachalam¹, Camila do Nascimento Moreira¹, Silvia Cordeiro das Neves^{1,2}, Henrique Rodrigues Scherer Coelho¹, Marcelo Luiz Brandão Vilela¹, Anelise Samara Nazari Formagio³, Valter Aragão do Nascimento², Rodrigo Juliano Oliveira^{1,2}

¹Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen), Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Faculdade de Ciências da Saúde (FCS), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Resumo

Guettarda viburnoides, uma planta da família Rubiaceae, é utilizada como anti-inflamatório e cicatrizante na medicina popular. Essa planta pode ser indicada inclusive para gestantes e considerando não haver estudos que descreva a segurança do uso desta planta durante o período gestacional; o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato etanólico de *G. viburnoides* (EEGv) no desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal de camundongos. Camundongos Swiss fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais (n=10): Grupo controle - os animais receberam o veículo (solução fisiológica) na proporção de 0,1 mL/10 g de peso corporal (p.c.) por via oral (gavagem; v.o.), do 1º ao 18º dia de gestação (d.g.); Grupos EEGv 300 e EEGV 1.000- os animais foram tratados com EEGV nas doses de 300 e 1.000 mg/Kg (p.c., vo.o.) do 1º ao 18º dia de gestação (d.g.), respectivamente. Os resultados demonstraram que o EEGv não alterou o desempenho reprodutivo e não alterou o desenvolvimento embriofetal. A frequência de malformações externas não teve diferença entre os grupos experimentais. No entanto, a frequência de malformações viscerais e esqueléticas aumentaram para a maior e a menor dose, respectivamente. Esses aumentos podem ser considerados variantes da normalidade. Frente ao exposto considera-se que o EEGv não altera o desempenho

reprodutivo, não altera o desenvolvimento embriofetal e possui baixo potencial teratogênico. Assim, caso essa planta seja utilizada no período gestacional o seu uso racional deve ser feito com cautela.

Palavras chaves: teratogênese, plantas medicinais, malformação, desenvolvimento embriofetal.

1. Introdução

Guettarda viburnoides é uma planta predominante em áreas florestais. Na América do Sul está presente no Paraguai e no Brasil. Neste último é frequentemente encontrada no Cerrado, na Amazônia, na Caatinga e na Mata Atlântica. Essa planta trata-se de arbustos que podem medir de 6 a 8 metros de altura, produzem flores tubulares, perfumadas, de cor amarelo-creme e seus frutos são drupas subglobosas que amadurecem do final de março até o início de julho. Cada fruto contém um único endocarpo lenhoso que contém entre 3 e 7 sementes e são conhecidas popularmente como “veludinho do campo”, “angélica” ou “araçá-branco” (Loayza *et al.*, 2011; Silva, 2017).

Na medicina tradicional *G. viburnoides* é utilizada como anti-inflamatório (Naressi *et al.*, 2015). Essa é a indicação etnofarmacológica, no entanto a literatura é escassa de estudos que compreendam o potencial terapêutico desta planta. Os estudos disponíveis em sua maioria versam sobre outras espécies do gênero *Guettarda*. O potencial anti-inflamatório está comprovado, em estudos experimentais, para *Guettarda pohliana* (Testa *et al.*, 2012), *Guettarda speciosa* (Kim *et al.*, 2020), *Guettarda crispiflora*, que também auxilia na melhora de lesão pulmonar aguda e gastrite (Lee *et al.*, 2022) e *Guettarda uruguayenses* (Duarte *et al.*, 2024).

Na literatura consultada somente um estudo foi encontrado com *G. viburnoides* (Neressi, *et al.*, 2015). Os autores identificaram em suas folhas ácido ursólico, ácido uncárico, secoxiloganina e grandiflorosídeo, juntamente com uma mistura de quercetina-3- O - β -D-galactopiranosídeo e quercetina-3- O - β -D -glucopiranósido, e de β -sitosterol e estigmasterol do extrato bruto da planta, foi realizada a administração tópica desse extrato em camundongos Swiss macho, o IC₅₀ encontrado variou de 18,92 a 26,47, e observou-

se que o extrato foi capaz de diminuir o edema causado por óleo de cróton 67,0 % -99,0%, e inibir a enzima MPO, evidenciando o potencial anti-inflamatório de *G. viburnoides*.

Não há registros na literatura consultada da toxicidade de *G. viburnoides*, os estudos encontrados são com outras plantas do gênero. Pode-se citar *Guettarda calipytrata*, um estudo com o extrato hidroalcóolico dessa planta administrada por via cutânea nas doses de 2000 mg/kg e 100mg/Kg não causou toxicidade e apresentou efeitos cicatrizantes em testes com ratos albinos Wistar. (Gaitén *et al.*, 2021).

Considerando a utilização dessas espécies na medicina popular, e a escassez de estudos com *G. viburnoides* e destacando que é comum o uso de plantas medicinais no Brasil, (Rodrigues *et al.*, 2011) inclusive por gestantes, considerando que estas são afetadas por processos inflamatórios e dores durante o período da gestação (Bernstein *et al.*, 2021) e consequentemente recorrem a métodos da medicina popular, (Araújo *et al.*, 2016) é necessário estabelecer a segurança do uso do Extrato Etanólico de *G. viburnoides* durante a gravidez. Diante do exposto esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do Extrato Etanólico de *G. viburnoides* no desenvolvimento reprodutivo e embriofetal de camundongos Swiss fêmeas.

2. Material e métodos

2.1 Material botânico e extração

As folhas e caules de *G. virbunoides* foram coletadas em abril de 2019, no município de Dourados-MS (22°48'53" S e 54°44'31" W), a espécie foi coletada e identificada pela Dra. Zefa Valdevina Pereira e um exemplar voucher foi depositado sobre um código de identificação DDMS2311. A planta foi cadastrada no Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Genéticos e conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen #A163977). Para a preparação do extrato etanólico de *G. Virbunoides*, folhas e caules foram lavados, secos e pulverizados (320 g). A extração por maceração foi realizada com etanol (4 L) durante 30 dias. O extrato foi então filtrado, concentrado sob pressão e liofilizado para obtenção do extrato etanólico (EEGV) (47 g), que foi armazenado sob refrigeração a 4 °C.

2.2 Animais

Foram utilizados 45 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, sendo 30 fêmeas e 15 machos, em idade reprodutiva (8-10 semanas). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais foram ambientados para adaptação durante um período de 7 dias em mini-isoladores de polisulfona, cobertas com maravalha de pinus, em rack ventilada Alesco® e mantidos em temperatura controlada 22°C (± 2 °C) com ciclo claro/escuro de 12 h, umidade de 55% ($\pm 10\%$) e livre acesso a água filtrada e ração comercial (Nuvital®). A pesquisa foi realizada de acordo com os protocolos da Declaração Universal dos Direitos Animais e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o parecer # 1.328/2024.

2.3 Delineamento Experimental

Os animais foram acasalados *overnight* na proporção de 2 fêmeas para 1 macho. A detecção da prenhez foi realizada por meio da observação do *plug* vaginal, sendo este considerado o dia zero de gestação (Oliveira et al., 2009; Gonçalves et al., 2013, 2014; David et al., 2014; Oliveira et al., 2015a; Ishikawa et al., 2018; Vani et al., 2018a). As fêmeas prenhes foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos experimentais (n=10): Grupo Controle – os animais receberam o veículo (solução fisiológica) na proporção de 0,1 ml/10 g de peso corporal (p.c.) por via oral (gavagem; v.o.), do 1º ao 18º dia de gestação (d.g.); Grupo EEGv300- os animais receberam 300mg/Kg de EEGv na proporção de 0,1mL/10 g (p.c.; v.o.); Grupo EEGv1000- os animais receberam 1000mg/Kg de EEGv na proporção de 0,1ML/10g.

2.4 Ensaios biológicos

No 18º d.g. os animais foram submetidos à eutanásia, por deslocamento cervical, seguida de laparotomia, histerectomia, onfalectomia e toracotomia para a coleta, pesagem e devido armazenamento dos órgãos (pulmão, coração, baço, fígado, rins, placenta) e fetos.

Imediatamente após a coleta fetal, os fetos foram eutanasiados com overdose de isoflurano utilizando sistema automático de anestesia inalatória (Bonther®). A liberação do Isoflurano foi realizada automaticamente pelo aparelho e a saturação da anestesia utilizada foi de 5%. A infusão de Isoflurano foi continuada até um minuto após o feto cessar os movimentos respiratórios (AVMA, 2020; Neves et al., 2024).

Os fetos coletados foram pesados e passaram por análise sistemática de malformações externas e sexagem. Em seguida, foram distribuídos aleatoriamente em dois subgrupos, cada um com aproximadamente 50% da ninhada. Os fetos do primeiro subgrupo foram fixados em acetona absoluta, por pelo menos sete dias, e destinados à análise esquelética pela técnica descrita por Staples e Schnell (1964) e modificada por Oliveira et al. (2009). Após a fixação os fetos foram eviscerados e mergulhados em solução de KOH (0,8%) para o processo de diafanização. Em seguida, foram adicionadas quatro gotas de *Alizarina Red*. Esta solução foi trocada a cada 24 horas durante quatro dias consecutivos. Depois dos fetos corados, a solução de KOH foi substituída pela solução clareadora (1 litro de glicerina: 1 litro de álcool etílico: 0,5 litros de álcool benzílico) e trocada a cada 24 horas, durante cinco dias consecutivos. As malformações foram classificadas com base nos estudos de Taylor (1986), Manson et al. (1994), Wise et al. (1997), Damasceno et al. (2008) e Oliveira et al. (2009). Os fetos do segundo subgrupo foram fixados em uma solução de Bodian's (água destilada (142 mL), ácido acético (50 mL), formaldeído (50 mL) e álcool 95% (758 mL) por pelo menos sete dias e destinados à análise visceral (Nunes et al., 2023; Ortiz et al., 2023, Rezende et., 2023) por meio de microdissecção com cortes estratégicos, para o estudo de tórax e abdômen, propostos por Barrow e Taylor (1969), e para estudo da cabeça segundo Wilson (1965), com alterações propostas por Oliveira et al. (2005), Damasceno et al. (2008) e Oliveira et al. (2009). A classificação das alterações viscerais foi baseada nos trabalhos de Taylor (1986), Manson e Kang (1994), Wise et al. (1997), Damasceno et al. (2008) e Oliveira et al. (2009).

As análises de vísceras e esqueletos fetais foram realizadas em lupa estereomicroscópica (Nikon® – SMZ 745T) com aumento de 2 vezes.

2.5 Parâmetros biométricos

Os parâmetros biométricos foram calculados conforme os dados do peso inicial (fêmeas pesadas no dia zero), peso final (fêmeas pesadas no 18º d.g.), ganho de peso (peso final - peso inicial), peso do útero e ganho de peso líquido (ganho de peso - peso do útero), além dos dados de pesos absolutos e relativos (peso do órgão / peso final do animal) do coração, pulmão, baço, rins e fígado.

2.6 Desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal

Foram quantificados e/ou calculados os parâmetros reprodutivos relativos ao número de implantes (n° de fetos vivos + n° de fetos mortos + n° de reabsorções); número de fetos vivos; viabilidade fetal (n° de fetos vivos $\times 100$ / n° de implantes); taxa de perdas pós implantacionais (n° de implantes - n° de fetos vivos) $\times 100$ / n° de implantes); número de reabsorção; taxa de reabsorção (n° de reabsorções $\times 100$ / n° de implantes); peso placentário; peso fetal; índice placentário (peso placentário / peso fetal); eficiência placentária (peso fetal / peso placentário); e razão sexual (número de fetos machos $\times 100$ / número de fetos fêmeas).

A classificação do peso fetal segundo a idade gestacional (CPFIG) foi feita de duas formas: (I) segundo Soulimane-Mokhtari et al. (2005) - os fetos foram considerados adequados para a idade gestacional (AIG) quando não divergiram mais que $\pm 1,7 \times$ desvio padrão (DP) da média dos fetos do controle; considerados pequenos para a idade gestacional (PIG) quando apresentaram peso corporal menor que $- 1,7 \times$ desvio padrão em relação à média dos fetos do grupo controle; e considerados grandes para a idade gestacional (GIG) quando apresentaram peso corporal maior que $+ 1,7 \times$ desvio padrão em relação à média do grupo controle; e (II) segundo Oliveira et al. (2009) - os fetos foram classificados como fetos com peso adequado para a idade da prenhez (PAIP) quando o peso do feto estava compreendido entre média de peso dos fetos do grupo controle mais ou menos o desvio padrão; fetos com baixo peso para a idade de prenhez (BPIP) quando o peso do feto é inferior à média de peso dos fetos do grupo controle menos o desvio padrão deste mesmo grupo; e fetos com elevado peso para a idade de prenhez (EPIP) quando o

peso do feto é superior à média do peso dos fetos do grupo controle mais o desvio padrão deste mesmo grupo. Soulimane-Mokhtari et al. (2005) classifica o peso dos fetos individualmente e Oliveira et al. (2009) classifica a ninhada de forma geral.

2.7 Análise estatística

Foi utilizado o teste ANOVA/Tukey para dados paramétricos, Kruskal-Wallis/Dunn para dados não paramétricos e o teste do Qui-quadrado para comparações de frequências entre os grupos. Os dados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média ou média $\pm$ desvio padrão e o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

3. Resultados

Parâmetros Biométricos

A avaliação dos parâmetros biométricos demonstrou que o peso final, ganho de peso, peso do útero, ganho de peso líquido (Figura 1A) e peso absoluto do coração, pulmão, fígado, rins e baço (Figura 1B) e peso relativo do coração, pulmão, rins e baço (Figura 1C) não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais. No entanto, os animais do grupo EEGv1000 iniciaram o experimento com peso superior ($p < 0,05$) aos demais grupos experimentais (Figura 1A). Observou-se também aumento ($p < 0,05$) do peso relativo do fígado no grupo EMFv300 ($p < 0,05$) (Figura 1C).

Desempenho reprodutivo

A avaliação do desempenho reprodutivo demonstrou que o número de implantes, fetos vivos, fetos mortos, reabsorções, taxa de perda pós-implantacional, taxa de reabsorção, viabilidade fetal e a razão sexual não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (Tabela 1).

Desenvolvimento embriofetal

A avaliação do peso fetal, do peso placentário e do índice placentário demonstram que não há diferenças significativas ($p>0,05$) entre o grupo controle e os grupos tratados com EEGv. No entanto, ao comparar os grupos tratados com o extrato verificou-se que ocorreu redução ($p<0,05$) do peso fetal, do placentário e do índice placentário do grupo EEGv1000 em relação ao grupo EEGv300. A eficiência placentária não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos experimentais (Tabela 2).

Em relação à adequação do peso a idade gestacional, segundo Soulimane- Mokhtari et al. (2005), a porcentagem de fetos PIG, AIG e GIG não variaram ($p>0,05$) entre os grupos experimentais. De acordo com Oliveira et al. (2009) todas as ninhadas apresentaram fetos com o peso adequado a idade gestacional (PAIG) ($p>0,05$) (Tabela 2).

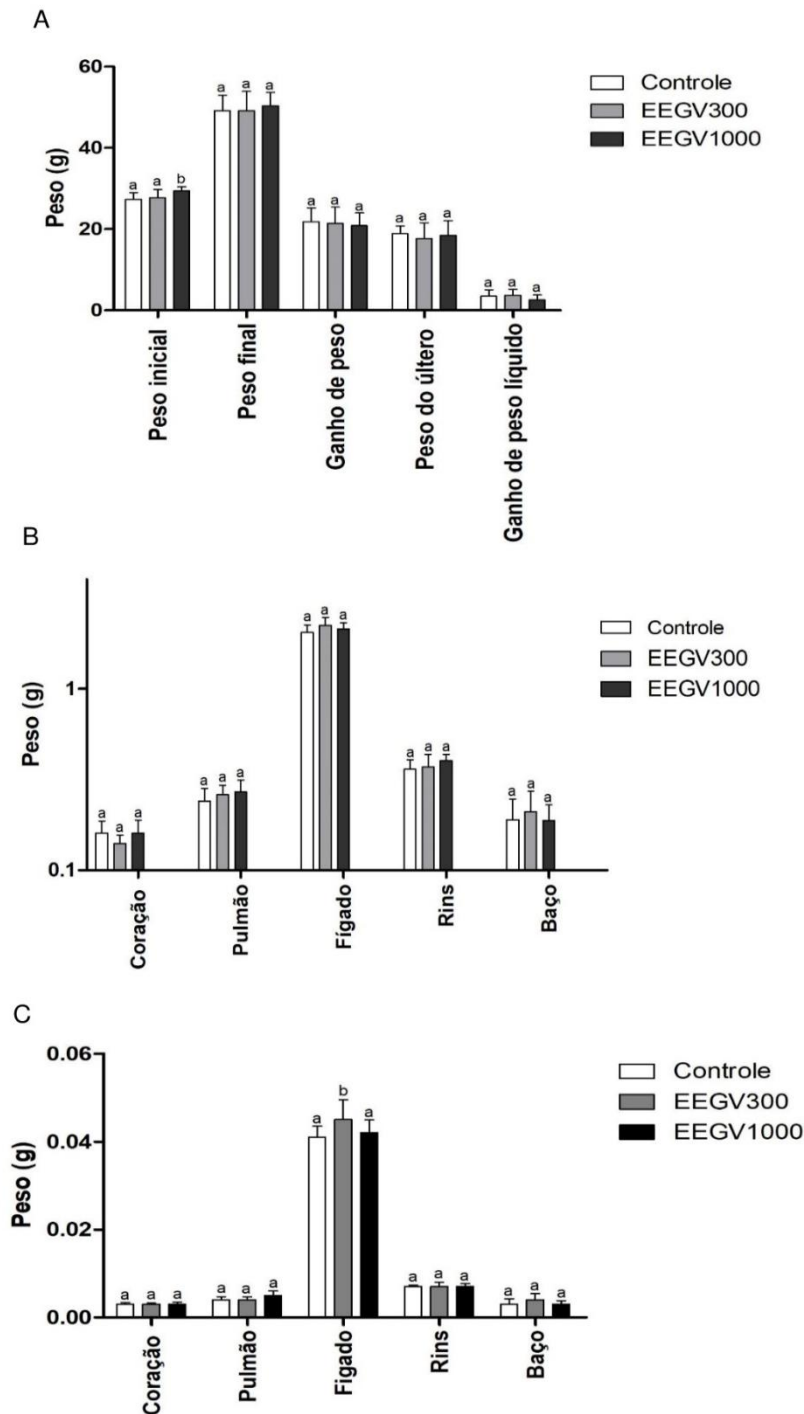


Figura 1- A - Média $\pm$ desvio padrão da média do peso inicial, peso final, ganho de peso, peso do útero e ganho de peso líquido. B - Média $\pm$ desvio padrão da média o peso absoluto dos órgãos. C - Média $\pm$ desvio padrão da média do peso relativo dos órgãos. Controle – Solução fisiológica NaCl (0,9%) na proporção de 0,1mL/10g de peso corpóreo (p.c.) por via oral (gavage, v.o.); EEGv - Extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* nas doses de 300 mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV300) e 1000mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV1000). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Teste estatístico: ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 1. Valores médios $\pm$ erro padrão da média dos parâmetros relativos ao desempenho reprodutivo das fêmeas tratadas com Extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* (EEGv).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle	EEGv 300 mg/KG	EEGv 1000mg/KG
Implantes	13,1 $\pm$ 0,69 ^a	13,7 $\pm$ 0,95 ^a	14,2 $\pm$ 0,59 ^a
Fetos Vivos	12,2 $\pm$ 0,57 ^a	11,6 $\pm$ 0,95 ^a	13,1 $\pm$ 0,87 ^a
Fetos Mortos	0,0 $\pm$ 0,00 ^a	0,3 $\pm$ 0,21 ^a	0,1 $\pm$ 0,10 ^a
Reabsorção	0,9 $\pm$ 0,27 ^a	1,8 $\pm$ 0,46 ^a	1 $\pm$ 0,42 ^a
TPPI	6,4 $\pm$ 1,93 ^a	15,7 $\pm$ 3,63 ^a	8,5 $\pm$ 3,38 ^a
TR	6,4 $\pm$ 1,93 ^a	13,7 $\pm$ 3,58 ^a	7,9 $\pm$ 3,48 ^a
Viabilidade Fetal	100,0 $\pm$ 0,00 ^a	95,5 $\pm$ 3,05 ^a	98,8 $\pm$ 1,17 ^a
Razão Sexual	2,3 $\pm$ 0,87 ^a	2,4 $\pm$ 0,080 ^a	1,4 $\pm$ 0,25 ^a

Legenda: TPPI – Taxa de perdas pós-implantacionais, TR – Taxa de reabsorção. Controle – Solução fisiológica NaCl (0,9%) na proporção de 0,1mL/10g de peso corpóreo (p.c.) por via oral (gavage, v.o.); EEGv - Extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* nas doses de 300 mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV300) e 1000mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV1000). Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significativas Teste Estatístico: Anova/Tukey (p>0,05).

Tabela 2. Valores médios $\pm$ erro padrão da média dos parâmetros relativos ao desenvolvimento embriofetal das fêmeas tratadas com Extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* (EEGv) e frequência (porcentagem) dos fetos distribuídos de acordo com a adequação do peso gestacional.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle	EEGv 300 mg/KG	EEGv 1000mg/KG
Peso Fetal ¹	1,27 $\pm$ 0,11 ^{ab}	1,29 $\pm$ 0,13 ^b	1,24 $\pm$ 0,12 ^a
Peso da Placenta ¹	0,075 $\pm$ 0,014 ^{ab}	0,080 $\pm$ 0,019 ^b	0,070 $\pm$ 0,016 ^a
Índice Placentário ¹	0,059 $\pm$ 0,001 ^{ab}	0,062 $\pm$ 0,001 ^b	0,057 $\pm$ 0,001 ^a
Eficiência Placentria ¹	17,43 $\pm$ 0,34 ^a	17,01 $\pm$ 0,40 ^a	18,75 $\pm$ 0,58 ^a
CFG ²			
PIG ^{2,3}	3,28	1,74	3,82
AIG ^{2,3}	91,8	91,3	94,66
GIG ^{2,3}	4,92	6,09	1,53
PAIG ^{3,4}		PAIG	PAIG

Legenda: Controle – Solução fisiológica NaCl (0,9%) na proporção de 0,1mL/10g de peso corpóreo (p.c.) por via oral (gavage, v.o.); EEGv - Extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* nas doses de 300 mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV300) e 1000mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV1000). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: ¹Anova/ Tukey $p < 0,05$). ²CFG - Classificação do feto de acordo com a idade gestacional segundo Soulimane-Mokhtari et al. (2005): PIG – pequeno para idade gestacional; AIG; adequado para idade gestacional; GIG – grande para idade gestacional (³Teste Estatístico: Qui-quadrado; $p > 0,05$). ⁴APIG - Adequação do Peso à Idade Gestacional – Classificação da ninhada de acordo com Oliveira et al. (2009): PAIP – Peso adequado para a idade gestacional (³Teste Estatístico: Qui-quadrado; $p > 0,05$).

A avaliação das malformações externas demonstrou a presença de hiperextensão e retroversão de membros; pata espalmada e cauda dobrada. A avaliação da frequência de malformações de forma individual ou global não demonstrou diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (Tabela 3).

Tabela 3. Número absolutos e porcentagem de malformações externas encontradas na prole de fêmeas tratadas com Extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* (EEGv).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle	EGV 300 mg/KG	EGV 1000mg/KG
Análise Externa			
Fetos Analisados	122	116	131
Fetos Normais	101	92	111
%	82,79	79,31	84,73
Hiperextensão de membros	14	19	14
%	11,48	16,38	10,69
Retroversão de membros	3	0	3
%	2,46	0,00	2,29
Pata espalmada	2	0	0
%	2,42	0,00	0,00
Cauda dobrada	1	3	0
%	1,21	3,78	0,00
Frequência de malfomação externa	20	21	17
% malfomação externa	16,39	18,97	12,98

Legenda: % - Porcentagem de fetos com malformações. Controle – Solução fisiológica NaCl (0,9%) na proporção de 0,1mL/10g de peso corpóreo (p.c.) por via oral (gavagem, v.o.); EEGv - Extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* nas doses de 300 mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV300) e 1000mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV1000). (Teste Estatístico: Quiquadrado; $p>0,05$).

A avaliação das malformações viscerais demonstrou a presença de hidrocefalia de grau leve e fenda palatina. A maior dose do EEGv aumentou ($p<0,05$) a frequência de hidrocefalia leve. Além disso, foi observado aumento ($p<0,05$) da frequência global de malformações para esse mesmo grupo (EEGv1000) (Tabela 4).

Tabela 4. Número absolutos e porcentagem de malformações viscerais encontradas na prole de fêmeas tratadas com Extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* (EEGv).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle	EGV 300 mg/KG	EGV 1000mg/KG
Análise Visceral			
Fetos Analisados	54	48	57
Fetos Normais	52	42	45
%	96,30	87,50	78,95
Hidrocefalia leve	2	6	11*
%	3,70	12,50	19,30
Fenda palatina	0	0	1
%	0,00	0,00	1,27
Frequência de malformação visceral	2	6	12*
% malformação visceral	3,70	12,50	21,05

Legenda: % - Porcentagem de fetos com malformações. Controle – Solução fisiológica NaCl (0,9%) na proporção de 0,1mL/10g de peso corpóreo (p.c.) por via oral (gavagem, v.o.); EEGv - Extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* nas doses de 300 mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV300) e 1000mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV1000).

* indica diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: Quiquadrado; $p < 0,05$).

A avaliação de malformações esqueléticas demonstrou a ocorrência de esterno anormal (todos os esternébrios estão anormais), esternébrio com ossificação incompleta, agenesia de esternébrio, hipercifose, escoliose e ossificação reduzida do crânio. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa ($p > 0,5$) na frequência de malformações na análise individual por alteração. No entanto, a avaliação de malformações globais (total de malformações ocorridas no grupo) demonstrou que a menor dose aumentou significativamente ($p < 0,05$) a frequência de malformações esqueléticas (Tabela 5).

Tabela 5. Número absolutos e porcentagem de malformações esqueléticas encontradas na prole de fêmeas tratadas com Extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* (EEGv).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle	EGV 300 mg/KG	EGV 1000mg/KG
Análise Esquelética			
Fetos Analisados	62	58	66
Fetos Normais	49	37	50
%	79,03	63,79	75,76
Cabeça			
OR Crânio	2	2	0
%	3,85	4,76	0,00
Tronco			
Esterno anormal	2	2	1
%	3,23	3,45	1,52
Eternébrio com ossificação incompleta	7	14	11
%	11,29	24,14	16,67
Agnesia de Estern brio	0	1	0
%	0,00	1,57	0,00
Hipercifose	1	0	5
%	1,61	0,00	7,58
Escoliose	1	1	0
%	1,27	1,72	0,00
Membros			
Agnesia de falange	0	3	0
%	0,00	5,17	0,00
Frequência de malfomação esquelética	13	23*	17
% malfomação esquelética	20,97	39,66	25,76

Legenda: % - Porcentagem de fetos com malformações. Controle – Solução fisiológica NaCl (0,9%) na proporção de 0,1mL/10g de peso corpóreo (p.c.) por via oral (gavagem, v.o.); EEGv - Extrato etanólico de *Guettarda viburnoides* nas doses de 300 mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV300) e 1000mg/Kg (p.c.; v.o.) (EEGV1000).

* indica diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: Quiquadrado; $p < 0,05$)

4. Discussão

A literatura consultada indica que não há dados disponíveis sobre o potencial toxicológico de *G. viburnoides* incluindo testes em reprodução e teratologia. Isso demonstra a necessidade e o pioneirismo deste estudo. Apesar da escassez de dados na literatura, devido à indicação popular, essa planta é vastamente utilizada no território brasileiro. Assim, o nosso estudo demonstrou ausência de sinais de toxicidade nas fêmeas tratadas com o EEGv. No entanto, aumentou a frequência de malformações na prole. O que sugere ausência toxicidade materna, porém sugere toxicidade embriofetal.

De acordo com a literatura consultada, os sinais clínicos de toxicidade incluem diarreia, tremores, salivação, diminuição do consumo de alimento e água, hipoatividade, convulsões, pelos eriçados, curvatura da cauda e perda de peso, principalmente (Christian, 2007; Corso *et al.*, 2019; Salustriano *et al.*, 2022; Ortiz *et al.*, 2023). Esses sinais não foram observados durante o período experimento. Além disso, o EEGv não alterou os parâmetros biométricos maternos e nem o peso absoluto e relativo dos órgãos, exceto o registro de um discreto aumento no peso relativo do fígado observado no grupo EEGv300. Destaca-se ainda que o grupo EEGv1000 iniciou o experimento com peso maior. No entanto, ao longo do desenvolvimento esse parâmetro foi normalizado visto que não houve diferença nos demais parâmetros biométricos medidos.

Em geral, a toxicidade está associada a perda de peso (Maimaiti, A; Jing-Jing, L; Shi, L., *et al* 2021) e essa pode ocorrer com redução do peso dos órgãos também (Arts *et al.*, 2019). Porém, nesse caso ocorreu o aumento do peso relativo do fígado. O fígado é um órgão metabolizador e, portanto, responsável por metabolizar xenobióticos e facilitar o seu processo de excreção (Mega *et al.*, 2021). Assim, xenobióticos podem causar aumento do fígado como uma tentativa de aumentar a metabolização e facilitar a excreção de produtos tóxicos (Wang *et al.*, 2014). Como o aumento do fígado aconteceu no peso relativo é possível inferir que tenha sido em resposta ao EEGv que poderia sugerir toxicidade. No entanto, esse dado tem pouca relevância biológica se considerado isoladamente e também porque nenhum sinal clínico de toxicidade foi observado.

Os parâmetros relativos ao desempenho reprodutivo (implantes, fetos vivos e mortos, reabsorção, taxas de perdas pós-implantações e reabsorção, viabilidade fetal e razão sexual) não foram alterados pelo tratamento das fêmeas com o EEGv. Esses parâmetros são considerados pela literatura especializada como capazes de identificar possíveis alterações no desempenho reprodutivo de fêmeas (Gonçalves *et al.*, 2013; Ishikawa *et al.*, 2018; Vani *et al.*, 2018; Salustriano *et al.*, 2022; Nunes *et al.*, 2023; Ortiz *et al.*, 2023; Rezende *et al.*, 2023; Neves *et al.*, 2024). Além disso, fatos como esse é comum na literatura da área já que fêmeas tratadas com *Gochnatia polymorpha* ssp. *Floccosa* (David *et al.*, 2014) *Gomphrena celosioides* (Salustriano *et al.*, 2022), *Casearia sylvestris* (Nagakoa *et al.*, 2023), *Salvia lachnostachys* Benth (Ortiz *et al.*, 2023) *Blutaparon portulacoides* (Neves *et al.*, 2024) também não alteraram o desempenho reprodutivo. No entanto, a literatura também registra plantas medicinais com a capacidade de alterar o desempenho reprodutivo. Assim cita-se *Peumus boldus* que aumentou a taxa de reabsorção fetal (Almeida *et al.*, 2000), *Gochnatia polymorpha* ssp. *Floccosa* (Pessatto *et al.*, 2017) que aumentou o índice placentário e *Luffa operculata* (Alves *et al.*, 2021) que aumentou a razão sexual.

Em relação ao desenvolvimento embriofetal o tratamento com EEGv não alterou o desenvolvimento embriofetal visto que não foram observadas alterações no peso fetal, peso placentário, índice placentário, eficiência placentária e na adequação do peso à idade gestacional nem quando foi avaliado o peso fetal, segundo Soulimane-Mokhtari *et al.* (2005), e nem quando se avaliou a ninhada, segundo Oliveira *et al.* (2009), visto que a frequência de fetos PIG, AIG e GIG não alteraram entre os grupos e nem a classificação da ninhada, respectivamente. Nesse caso há uma concordância entre a avaliação pelo método de Soulimane-Mokhtari *et al.* (2005) e Oliveira *et al.* (2009). Essa mesma concordância foi observada nos estudos de Salustriano *et al.* (2022) *Piper glabratum* Kunth (Nunes *et al.*, 2023) e *Blutaparon portulacoides* (Neves *et al.*, 2024). No entanto, a literatura especializada também registrou discordância entre essas duas metodologias (David *et al.*, 2014; Pessatto *et al.*, 2017; Vani *et al.*, 2018).

Apesar da ausência de diferenças dos grupos tratados com EEGv e o controle, os dois grupos tratados com EEGV, nas doses de 300 e 1.000mg/Kg apresentaram diferenças entre si. Assim observou-se aumento do peso fetal, do peso placentário e do índice placentário do grupo tratado com a dose de 300mg/Kg em relação ao grupo tratado com a dose de 1.000mg/Kg. Apesar dessas variações a adequação do peso fetal entre essas duas doses não apresentaram diferenças. Assim, pode-se sugerir que a dose de 300mg/Kg causou adaptações maternas na tentativa de enviar mais nutrientes e oxigênio para feto. Pode ser sugerido pelo aumento do peso placentário e, por consequência, aumento do índice placentário. No entanto, essas adaptações não alteraram a eficiência placentária apesar do discreto aumento do peso fetal ocorrido nesse grupo. Apesar do registro desses dados, eles apresentam baixa relevância biológica nesse contexto visto que não se registrou alterações em relação ao grupo controle.

Em geral, quando fêmeas prenhes são expostas a xenobióticos esse podem alterar o desenvolvimento embriofetal porque alteram a morfologia placentária ou o fluxo sanguíneo placentário que são responsáveis por garantir a nutrição e a oxigenação adequada do feto (Morel *et al.*,2016) Assim, na eminência de faltar nutrientes e/ou oxigênio para uma adequada formação e crescimento embriofetal seria esperado que a placenta aumentasse de tamanho aumentando assim o aporte de sangue, contendo nutrientes e oxigênio, para o feto (Kosińska-Kaczyńska K.,2022). Esse fato poderia representar uma adaptação materna na tentativa de suprir as necessidades da prole em desenvolvimento (Kosińska-Kaczyńska K.,2022) Essa alteração se bem-sucedida por determinar o crescimento adequado da prole (Pessatto *et al.*,2017) e/ou o nascimento de fetos macrossômicos (Paula *et al.*,2020). Por outro lado, se apesar da adaptação materna o suprimento de nutrientes e/ou oxigênio não for o suficiente podem nascer fetos pequenos para a idades gestacional (Wilson; Ford.,1999) o que seria um importante indicativo de toxicidade embriofetal (Salustriano *et al.*,2022) para o composto em estudo. Exemplo de estudo com plantas medicinais com fetos macrossômicos ou com baixo peso ao nascimento pode ser encontrados na literatura. Assim, as plantas *Gochnatia polymorpha* subsp. *Floccosa* (Pessatto *et al.*, 2017), *Doliocarpus dentatus* (Ishikawa *et al.*,2018) e *Phyllanthus niruri* (Paula *et al.*, 2020) estão relatadas como capazes de induzir

o nascimento de fetos macrossômicos e as plantas *Curatella americana* L. (Cruz *et al.*, 2022), *Salvia lachnostachys* (Ortiz *et al.*, 2023) e *Piper glabratum* Kunth (Nunes *et al.*, 2023) estão relatadas como capazes de induzir o nascimento de fetos com baixo peso para a idade gestacional.

Em relação ao desenvolvimento embriofetal não houve diferença significativa entre os grupos experimentais na presença das malformações externas. Na avaliação das malformações viscerais observou-se que a maior dose aumentou a frequência das malformações viscerais, principalmente por aumentar a frequência de hidrocefalia leve. No entanto, sabe-se que as hidrocefalias leves podem regredir ao nascimento (Ortiz *et al.*, 2023). Assim, esse parâmetro pode ser considerado uma variante da normalidade (Taylor, 1986; Gonçalves *et al.*, 2013; De-David *et al.*, 2014; Vani *et al.*, 2018; Ishikawa *et al.*, 2018; Salustriano *et al.*, 2022; Nunes *et al.*, 2023; Ortiz *et al.*, 2023; Neves *et al.*, 2024) e, isoladamente, pode ter baixa relevância biológica.

Nas malformações esqueléticas a análise individual não demonstrou variação entre os grupos. No entanto, numa avaliação global observou-se que na dose intermediária (EEGv300) aumento da frequência observada de malformações em 1,77x. Apesar desse aumento, as alterações esqueléticas observadas são compatíveis com a vida e/ou podem regredir no final da gestação ou após o nascimento (quando se trata de ossificação incompleta – a alteração mais verificada) já que os fetos foram retirados no 18ºdg e o nascimento aconteceria no 21ºdg. No entanto, também foram registradas outras alterações como hipercifose e escoliose, que apesar de não desejadas, são compatíveis com a vida e, portanto, são consideradas malformações menores. Fato interessante a ser relatado é que não foi observado um padrão dose-resposta já que a frequência de malformações esqueléticas foi maior na dose de 300mg/Kg, que apresentou diferença em relação ao grupo controle, enquanto a maior dose (1000mg/Kg) não diferiu do controle. Esse fato, quando a menor dose tem efeitos adversos maiores não é incomum na literatura e já foi relatada por Ortiz *et al.* (2022) e Nunes *et al.* (2023). No entanto, a relação dose-resposta, ou seja, quando com o aumento da dose também ocorre aumento da frequência de malformações, foi relatado nos estudos de Salustriano *et al.* (2023) e Rezende *et al.* (2023).

Destaca-se ainda que apesar da menor dose ter aumentado a frequência de malformações esqueléticas nos grupos tratados com o EEGv, essa frequência é baixa em relação ao grupo controle, e em relação a outros estudos da área, ou seja, há estudos onde o controle negativo apresentou maior frequência de malformações esqueléticas (David *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2023; Rezende *et al.*, 2023; Neves *et al.*, 2024) do que as observadas nesse estudo. Assim, mesmo diante dessa diferença estatisticamente significativa esse fato pode ter baixa relevância biológica. Outro fato a ser relatado é que os trabalhos usados nessa comparação são do mesmo grupo de estudo e, portanto, as colônias de animais são as mesmas o que torna essa inferência mais robusta.

Diante do exposto considera-se que o EEGv tem baixo potencial teratogênico, não altera o desenvolvimento embrionário e não causa maternotoxicidade. Assim, o seu uso na gestação não seria contraindicado. No entanto, deve ser feito com cautela.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. et al. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. p. 99–102, 2000

ALVES, C. DOS S. et al. *Luffa operculata* at a late period of gestation dysregulates melatonin and cytokines interfering with weight of dams and their male offspring. **Journal of ethnopharmacology**, v. 275, n. 113867, p. 113867, 2021.

ARAÚJO, C. R. F. DE *et al.* Use of Medicinal Plants with Teratogenic and Abortive Effects by Pregnant Women in a City in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 38, n. 3, p. 127–131, mar. 2016.

ARTS, J. et al. Evaluation of developmental toxicity of Methyl Chloride (Chloromethane) in rats, mice, and rabbits. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 103, p. 274–281, 2019.

BARROW, M. V.; TAYLOR, W. J. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. **Journal of morphology**, v. 127, n. 3, p. 291–305, 1969.

BERNSTEIN, N. *et al.* Is it safe to consume traditional medicinal plants during pregnancy? **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 4, p. 1908–1924, abr. 2021.

Damasceno DC. Anomalias congênitas: estudos experimentais. COOPMED; 2008.

DAVID, N. DE *et al.* *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 370–379, 11 jun. 2014.

DUARTE, A. F. S. *et al.* *Guettarda uruguensis* (Rubiaceae): antioxidant and anti-inflammatory plant with quercetin and esters of p-coumaric acid. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2024.

GAITÉN, Y. I. G. *et al.* Phytochemical profile, acute dermal toxicity and wound healing activity of *Guettarda calyptata* A. Rich. **Journal of Herbmec Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 249–256, 7 jan. 2021

GONÇALVES, C. A. *et al.* Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: Teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 843–850, 12 dez. 2013.

HAYASHI, M. *et al.* The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research Letters**, v. 245, n. 4, p. 245–249, 1990.

ISHIKAWA, R. B. *et al.* The safe use of *Doliocarpus dentatus* in the gestational period: Absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 1–6, 10 maio 2018.

KIM, K. H. *et al.* The methanol extract of *Guettarda speciosa* Linn. Ameliorates acute lung injury in mice. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, p. 40, 7 fev. 2020.

KOSIŃSKA-KACZYŃSKA, K. Placental syndromes—A new paradigm in perinatology. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 12, p. 7392, 2022.

LOAYZA, A. P.; LOISELLE, B. A.; RIOS, R. S. Context-dependent recruitment of *Guettarda viburnoides* in a Neotropical forest–savanna mosaic. **American journal of botany**, v. 98, n. 8, p. 1317–1326, 2011.

LEE, D. *et al.* *Guettarda crispiflora* Vahl Methanol Extract Ameliorates Acute Lung Injury and Gastritis by Suppressing Src Phosphorylation. **Plants**, v. 11, n. 24, p. 3560, 16 dez. 2022.

LIMA, L. F. *et al.* Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae). **Biota Neotropica**, v. 10, p. 155–160, mar. 2010.

MAIMAITI, A.; JING-JING, L.; SHI, L. Investigating the acute and sub-acute toxicity of medicinal *Cuscuta chinensis* Lam plant. **Journal of ethnopharmacology**, v. 273, n. 114005, p. 114005, 2021.

MANSON, J. C. *et al.* 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Molecular neurobiology**, v. 8, n. 2–3, p. 121–127, 1994.

MEGA, A. *et al.* Food and nutrition in the pathogenesis of liver damage. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1326, 2021.

MOREL, Y. *et al.* Evolution of steroids during pregnancy: Maternal, placental and fetal synthesis. **Annales d'endocrinologie**, v. 77, n. 2, p. 82–89, 2016.

NARESSI, M. A. *et al.* CHEMICAL CONSTITUENTS, ANTI-INFLAMMATORY, AND FREE-RADICAL SCAVENGING ACTIVITIES OF *Guettarda viburnoides* CHAM. & SCHLTDL. (RUBIACEAE). **Química Nova**, v. 38, p. 932–936, ago. 2015.

NEVES, S. C. DAS *et al.* Absence of adverse effects of *Blutaparon portulacoides* (A.St.-Hil.) Mears in mice exposed during pregnancy. **South African Journal of Botany**, v. 166, p. 52–59, 1 mar. 2024.

NUNES, R. C. S. *et al.* The Ethanolic Extract of *Piper glabratum* Kunth Is Teratogenic and Interferes with the Ossification Process of Swiss Mice Fetuses. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 3, p. 430, 11 mar. 2023.

OLIVEIRA, R. J. et al. Effects of the polysaccharide beta-glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 53, n. 3, p. 164–173, 2009.

OLIVEIRA, R. J. et al. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 1, p. 834–849, 2015.

ORTIZ, H. C. *et al.* The ethanolic extract of *Salvia lachnostachys* Benth is not maternotoxic, does not alter reproductive performance, but has teratogenic potential. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, p. 145, 4 maio 2023.

REZENDE, G. C. D. *et al.* Absence of maternal-fetal adverse effects of *Alternanthera littoralis* P. Beauv. following treatment during pregnancy in mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 86, n. 16, p. 543–556, 18 ago. 2023.

RODRIGUES, H. G. *et al.* Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 359–366, 2011.

SALUSTRIANO, F. R. *et al.* The Ethanolic Extract of *Gomphrena celosioides* Mart. Does Not Alter Reproductive Performance or Embryo-Fetal Development, nor Does It Cause Chromosomal Damage. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 2369, nov. 2022

Taylor P. Practical teratology. London: Academic Press; 1986.

TESTA, G. *et al.* Constituintes químicos das folhas e avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos das raízes e folhas de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 35, p. 527–529, 2012.

PINA, E. M. L. *et al.* Pharmacological screening and acute toxicity of bark roots of *Guettarda platypoda*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1315–1322, dez. 2012.

REZENDE, G. C. D. *et al.* Absence of maternal-fetal adverse effects of *Alternanthera littoralis* P. Beauv. following treatment during pregnancy in mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 86, n. 16, p. 543–556, 18 ago. 2023.

RODRIGUES, E.; MENDES, F.; NEGRI, G. Plants Indicated by Brazilian Indians for Disturbances of the Central Nervous System: A Bibliographical Survey. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 211–244, 1 set. 2006.

VANI, J. M. *et al.* Evaluation of the effects of the larvicides temephos on reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity of Swiss mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 148, p. 22–27, 1 jun. 2018.

WANG, Y.-M. *et al.* Pregnane X receptor and drug-induced liver injury. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 10, n. 11, p. 1521–1532, 2014.

WILSON, J. C.; WARKANY, J. **Teratology: Principles and Techniques**. [s.l.] Chicago: Univ. of Chicago Press, 1965.

WILSON, M. E.; FORD, S. P. Comparative aspects of placental efficiency. **Reproduction**, p. 223–232, 1999.

ILSON, J. G. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. **Teratology**, v. 262, 1965.

WISE, L. D. *et al.* Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1). **Congenital anomalies**, v. 37, n. 2, p. 165–210, 1997.

ANEXO 3

05/07/2024, 11:54

SEIUFMS - 4937397 - Certificado



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos tóxico-reprodutivos, teratogênicos e (anti)genotóxicos dos extratos de plantas com possíveis efeitos medicinais em modelo pré-clínico/Evaluation of the toxic-reproductive, teratogenic and (anti)genotoxic effects of plant extracts with possible medicinal effects in a preclinical model – Phase II", registrada com o nº 1.328/2024, sob a responsabilidade de Rodrigo Juliano Oliveira - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, em reunião de 01/07/2024.

Finalidade	() Ensino	(x) Pesquisa
Vigência da Autorização	02/09/2024 a 11/06/2029	
Espécie/linhagem/raça	Mus musculus / Swiss	
Nº de animais	972 (432 fêmeas e 540 machos)	
Peso/idade	30-35g / 6-8 semanas	
Sexo	Machos e fêmeas	
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul	

Fábio José Carvalho Faria
Coordenador da CEUA/UFMS
Campo Grande, 04 de julho de 2024

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por Fábio José Carvalho Faria, Presidente de Comissão, em 05/07/2024, às 11:15, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4937397 e o código CRC 6527D4CB.

https://sei.ufms.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=5699448&infra_sistema... 1/2

05/07/2024, 11:54

SEIUFMS - 4937397 - Certificado

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária
Fone: (67) 3345-7925
CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.015683/2024-12

SEI nº 4937397