

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

ROGÉRIO CARLOS SANFELICE NUNES

**O EXTRATO ETANÓLICO DE *PIPER GLABRATUM* É TERATOGENICO E
INTERFERE NO PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO DE FETOS DE CAMUNDONGOS
*SWISS***

CAMPO GRANDE
2023

ROGÉRIO CARLOS SANFELICE NUNES

**O EXTRATO ETANÓLICO DE *PIPER GLABRATUM* É TERATOGÊNICO E
INTERFERE NO PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO DE FETOS DE CAMUNDONGOS
*SWISS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Tecnologia em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

CAMPO GRANDE
2023



Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Doutorado

Aos trinta e um dias do mês de março do ano de dois mil e três, às catorze horas, na Sala 204 - Bloco 9 (FAMED), da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Rodrigo Juliano Oliveira (UFMS), Carlos Alberto Eloy Tavares (UCDB), Fernando Luiz de Arruda (UFMS), Fernando Pierette Ferrari (UFMS) e Rondon Tosta Ramalho (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **ROGÉRIO CARLOS SANFELICE NUNES**, CPF 33179492015, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE PIPER GLABRATUM NO DESEMPENHO REPRODUTIVO E DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL DE CAMUNDOS SWISS" e orientação de Rodrigo Juliano Oliveira. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dr. Rodrigo Juliano Oliveira (Interno)		Aprovado
Dra. Anna Maria Duarte Miglioli (Externo) (Suplente)		Aprovado
Dr. Carlos Alberto Eloy Tavares (Externo)		Aprovado
Dr. Fernando Luiz de Arruda (Externo)		Aprovado
Dr. Fernando Pierette Ferrari (Externo)		Aprovado
Dr. Rondon Tosta Ramalho (Interno)		Aprovado
Dr. Valtér Aragão do Nascimento (Interno) (Suplente)		Aprovado

RESULTADO FINAL:

Aprovação Aprovação com revisão Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluno

AGRADECIMENTOS

Na nossa trajetória pessoal há inúmeros momentos em que nos sentimos sós e necessitando de um apoio incondicional quando em busca de um direcionamento.

A leitura e a reflexão em muito nos auxiliam nesses momentos de angústia em que somos provados e verdadeiramente testados.

Viktor Frankl refere que: “Quando a situação for boa, desfrute-a. Quando a situação for ruim, transforme-a. Quando a situação não puder ser transformada, transforme-se”.

Stephen Covey afirma que: “Eu não sou um produto das minhas circunstâncias, sou um produto das minhas decisões”.

Henry Ford nos encoraja e também nos desafia: “Quando tudo parecer ir contra você, lembre-se que o avião decola contra o vento, não a favor dele”.

A pós-graduação representou um caminho novo e um outro viés nas minhas atividades profissionais e que, embora tenha apresentado dificuldades esperadas e inerentes à produção do conhecimento ou mesmo não esperadas e representadas pela pandemia do coronavírus com seus inúmeros reflexos pessoais, profissionais e na área do ensino, momento em que nos tornamos “virtuais”, foi indiscutivelmente enriquecedor.

Registro aqui os meus agradecimentos àqueles que compartilharam comigo suas opiniões, apoio e exercitaram a “arte de ouvir” e, para citar Rubem Alves, a “arte da escutatória”, tão importante e tão rara nos dias atuais. Portanto, muito obrigado ao meu querido filho Eduardo e ao amigo Ramon Ovando pela “escuta semanal”.

O meu muito obrigado pelo apoio incondicional da minha esposa Cristina em absolutamente todos os momentos e cuja disciplina e dedicação no cumprimento das tarefas e objetivos propostos que a caracterizam sempre me mantiveram direcionado durante esse período.

“Os que confiam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam”

(Isaías 40:31).

RESUMO

Piper glabratum é uma planta usada tradicionalmente para o tratamento da dor e da inflamação. Essa planta é consumida inclusive por gestantes. Assim, avaliou-se os efeitos do extrato etanólico das folhas de *P. glabratum* (EEPg) no desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal de camundongos Swiss. Fêmeas prenhes foram tratadas com 100, 1.000 e 2.000mg/Kg durante todo o período gestacional por gavagem (v.o). O grupo controle recebeu água destilada na proporção de 0,1mL/10g (v.o.). Os resultados demonstraram que o EEPg tem baixo potencial maternotóxico e não altera o desempenho reprodutivo de fêmeas. No entanto, alterou o desenvolvimento embriofetal e causou redução do peso fetal (aumentando a frequência de fetos pequenos para a idade gestacional) nas duas maiores doses. Além disso, interferiu no peso placentário, no índice placentário e na eficiência placentária. A frequência de malformações viscerais aumentou em 2,8x para a menor dose de EEPg e as malformações viscerais aumentaram em 2,48x, 1,89x e 2,11x para as doses de 100, 1.000 e 2.000 mg/Kg de EEPg, respectivamente. Destaca-se que 100% das proles tratadas com EEPg apresentaram alteração no processo de ossificação. Assim, considera-se que o EEPg tem baixo potencial materno tóxico e não altera o desempenho reprodutivo das fêmeas; porém, é teratogênico e interfere, principalmente, no processo de ossificação, razão pela qual o seu uso é contraindicado no período gestacional.

Descritores: piperaceae; planta medicinal; malformação; osso; desenvolvimento embriofetal.

ABSTRACT

Piper glabratum is a plant traditionally used for the treatment of pain and inflammation. This plant is ever consumed by pregnant women. The effects of the ethanol extract of *Piper glabratum* (EEPg) leaves on the reproductive performance and embryofetal development of Swiss mice were evaluated. Pregnant females were treated with 100, 1.000 and 2.000 mg/kg throughout the gestational period per gavage. The control group received distilled water in the proportion of 0,1ml/10g. The results showed that EEPg has a low maternal-toxic potential and does not alter the reproductive performance of females. However, it altered embryofetal development and caused fetal weight reduction in the two highest doses. In addition, it interfered with placental weight, placental index and placental efficiency. The frequency of visceral malformations increased by 2,48, 1,89 e 2,11 with the dosages of 100, 1.000 and 2.000 mg/kg of EEPg respectively. It was observed that 100% of the offspring treated with EEPg showed changes in the ossification process. Therefore, it is considered that EEPg has a low maternal-toxic potential and does not alter the reproductive performance of females. However, it is teratogenic and interferes mainly in the ossification process and therefore its use is contraindicated during pregnancy.

Descriptors: piperaceae; medicinal plant; malformation; bone; embryofetal development.

LISTA DE ABREVIações

AIG - Adequados para a idade gestacional

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPIP - Baixo peso para a idade de prenhez

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CPFIG - Classificação do peso fetal segundo a idade gestacional

D.G - Dia gestacional

DP - Desvio padrão

EEPg – Extrato Etanólico de Piper Glabratum

EPIP - Elevado peso para a idade de prenhez

GIG - Grandes para a idade gestacional

OECD – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAIP - Peso adequado para a idade da prenhez

PIG - Pequenos para a idade gestacional

PNPM - Programa Nacional de Plantas Mediciniais

RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

Renisus - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse para o SUS

SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético

SUS - Sistema Único de Saúde

UFGD - Universidade Federal da Grande Dourados

UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Unicef - Fundo das Nações Unidas para a Infância

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores médios \pm erro padrão da média dos parâmetros biométricos das fêmeas tratadas com o extrato etanólico de <i>P. glabratum</i> (EEPg).....	33
Tabela 2- Valores médios \pm erro padrão da média dos pesos absolutos e relativos dos órgãos das fêmeas tratadas com o extrato etanólico de <i>P. glabratum</i> (EEPg).....	34
Tabela 3- Valores médios \pm erro padrão da média dos parâmetros relativos ao desempenho reprodutivo das fêmeas tratadas com o extrato etanólico de <i>P. glabratum</i> (EEPg).....	34
Tabela 4- Valores médios \pm erro padrão da média dos parâmetros relativos ao desenvolvimento embriofetal das fêmeas tratadas com o extrato etanólico de <i>P. glabratum</i> (EEPg).....	35
Tabela 5- Número absolutos e porcentagem de malformações externas encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico de <i>P. glabratum</i> (EEPg).....	36
Tabela 6- Número absolutos e porcentagem de malformações viscerais encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico de <i>P. glabratum</i> (EEPg).....	37
Tabela 7- Número absolutos e porcentagem de malformações esqueléticas encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico de <i>P. glabratum</i> (EEPg).....	38

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISAO DE LITERATURA	13
2.1 Plantas medicinais	13
2.2 <i>Piper glabratum</i>	16
2.3 Teratogenecidade	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Material vegetal do extrato de P. Glabratum	23
3.2 Animais	23
3.3 Delineamento Experimental	23
3.4 Ensaio biológicos	24
3.5 Parâmetros biométricos	25
3.6 Desempenho reprodutivo e desenvolvimento embrionário	25
3.7 Análise estatística	26
4 RESULTADOS	27
Artigo : O extrato etanólico de <i>Piper glabratum</i> é teratogênico e interfere no processo de ossificação de fetos de camundongos <i>Swiss</i>	28
Resumo	29
1. Introdução	30
2. Material e Métodos	30
2.1 Material Vegetal do Extrato de P. Glabratum	30
2.2 Animais	31
2.3 Delineamento Experimental	31

2.4. Ensaio biológico	31
2.5. Parâmetros biométricos	32
2.6. Desempenho reprodutivo e desenvolvimento embrionário	32
2.7 Análise estatística	33
3. Resultados	33
3.1 Parâmetros Biométricos	33
3.2. Desempenho reprodutivo	34
3.4. Desenvolvimento embrião-fetal	35
Agradecimentos	42
5. Referências	42
6 CONCLUSÃO	46
7 REFERÊNCIAS	47
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA	51
ANEXO B – ARTIGO	52

1 INTRODUÇÃO

A falta de atendimento médico de qualidade e eficiente é um problema no Brasil, em especial, para aquelas pessoas que vivem em área distantes dos grandes centros. Assim, o uso de plantas medicinais é uma alternativa para o atendimento da Atenção Primária em Saúde. Esse fato tem estimulado cada vez mais o uso da medicina tradicional que é coincidente com políticas públicas fomentadas pelo Ministério da Saúde do Brasil, pela Organização Mundial da Saúde e pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância.

No Brasil há a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o SUS (Rennisus). Nesta relação há 70 plantas que estão em estudo, mas que já são utilizadas pela população e, inclusive, prescritas para alguns tipos de sintomas/doenças; porém, a medicina tradicional brasileira tem muitas outras plantas que são usadas. Isso acontece devido à grande biodiversidade brasileira e também devido aos regionalismos que interferem na indicação das plantas, ou seja, cada comunidade tradicional possui um tipo de conhecimento que é e foi acumulado ao longo das gerações.

Piper glabratum, apesar de não fazer parte do Rennisus, é uma planta utilizada no Mato Grosso do Sul com indicação etnofarmacológica para o tratamento de dor, inflamação e também como diurético. Produtos preparados a partir dessa planta são utilizados pela população em geral e, inclusive, por gestantes. No entanto, apesar da literatura ter confirmado as suas indicações etnofarmacológicas não há nenhum registro sobre o consumo dessa planta no período gestacional. Esse fato demonstra o ineditismo, o pioneirismo e a necessidade desse estudo, uma vez que o senso comum refere que os produtos naturais não fazem mal.

Diante do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo a avaliação dos efeitos do extrato etanólico da *Piper glabratum* no desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal de camundongos Swiss.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

Qualquer planta utilizada para prevenir ou tratar doenças e/ou aliviar sintomas de uma doença é considerada uma planta medicinal. No entanto, apesar das espécies vegetais possuírem muitos compostos químicos, os quais podem ser princípios ativos de medicamentos, a planta só é considerada medicinal quando ela for utilizada pela população ou por uma comunidade para o tratamento de alguma doença (BASSO; LOCATELLI, 2020; DI STASI, 2007). A partir desse momento ela passa a ter uma indicação popular. Algumas delas são usadas há muitos anos e podem remontar séculos, décadas ou anos. Foi a partir desse interesse pelo uso e o conhecimento das plantas medicinais, usada por diferentes culturas, que se originou a Etnobotânica. Logo, a Etnobotânica é a ciência que investiga as relações entre os povos e as plantas e o consumo dessas para a prevenção e o tratamento de doenças (BASSO; LOCATELLI, 2020; COUTINHO; TRAVASSOS; AMARAL, 2002). Nesse ínterim nasceu a medicina popular.

A medicina popular, por sua vez, é uma ciência informal que é praticada por agentes da comunidade que garantem a sobrevivência dos conhecimentos tradicionais acumulados ao longo de gerações por meio da repetição de gestos milenares de cura. Um exemplo desses agentes da comunidade são os(as) raizeiros(as) que mantem vivo o segredo do valor tradicional da flora, visto que conhecem as plantas e as suas indicações, inclusive particionadas, já que folhas, casca, resina, caule, frutos e sementes, por exemplo, possuem indicações distintas (ARAÚJO, 1981).

Os raizeiros conhecem a botica sertaneja e em suas bancas, em feiras e/ou mercados municipais, ensinam o valor e a forma de uso de plantas medicinais. Esse conhecimento, geralmente, é herdado dos pais bem como a prática de coletar as plantas no campo, armazená-las e prepará-las (ARAÚJO, 1981).

Coutinho, Travassos e Amaral (2002), relatam que há registros primitivos que indicam que os povos antigos tinham interesse pelo meio ambiente e, em especial, pelas plantas medicinais. Logo, a medicina tradicional remonta dessa época. Desde então, as propriedades terapêuticas de espécies vegetais veem sendo compiladas e transmitidas de geração para geração e constituem juntamente com outras práticas

terapêuticas, um sistema médico, conhecido como medicina tradicional (ABÍLIO, 2011).

Inicialmente, a medicina tradicional não era considerada um sistema médico. O uso de remédios à base de ervas, iniciado nas tribos primitivas, era baseado no extrativismo vegetal realizado pelas mulheres que eram responsáveis pelas coletas e preparações. Elas extraíam os princípios ativos que promoviam as curas. Com o passar dos tempos essas comunidades primitivas se organizaram e um dos principais personagens era o do curandeiro que detinha um repertório secreto de substâncias que poderiam garantir a sobrevivência por mais tempo, bem como eram capazes de promover encontros com as divindades por meio de plantas alucinógenas. O curandeiro, em geral, passava o seu conhecimento para poucos aprendizes que eram escolhidos e preparados para dar continuidade ao seu trabalho (FRANÇA *et al.*, 2008; SIMON, 2001).

O registro do primeiro fitoterápico data de 2838-2698 A.C. quando foram catalogadas 365 ervas medicinais e venenos na China. Esse registro também se refere ao primeiro herbário de que se tem conhecimento. Desde então, essas práticas se desenvolveram e já no século XIX o empirismo da alquimia foi superado pela química experimental. A partir daí foi possível iniciar a produção de substâncias orgânicas por meio de síntese e isso foi determinante para a revolução industrial e tecnológica que desencadeou a produção acelerada e em escala de medicamentos. Assim, reduziu-se a utilização de plantas e de seus princípios ativos e em seu lugar vislumbrou-se a utilização cada vez maior de drogas sintéticas. No entanto, derivados puros e concentrados de plantas nunca tiveram seus usos totalmente descontinuados (BRATMAN, 1998; FRANÇA *et al.*, 2008; SIMON, 2001; VALE, 2002). Além disso, eles são ainda hoje importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos (GALUCIO *et al.*, 2021). Nesse contexto surgiu o advento da medicina científica.

A medicina científica garantiu à humanidade o aumento da expectativa de vida já que no cotidiano das práticas de saúde fez-se a aplicação de princípios científicos que desencadearam a descoberta de terapêuticas que melhoraram a qualidade de vida das pessoas (FRANÇA *et al.*, 2008). Dessa forma, vivenciou-se quase que uma substituição completa do uso de plantas medicinais pelo uso dos medicamentos sintéticos; porém, isso tem sofrido mudanças nos últimos tempos. (BRATMAN, 1998; FRANÇA *et al.*, 2008; SIMON, 2001).

O uso de plantas medicinais, como método alternativo para o tratamento de doenças tem ganhado espaço, novamente, no cotidiano do brasileiro. A confirmação desse fato deve-se ao Programa Nacional de Plantas Medicinais (PNPM) do Ministério da Saúde. O objetivo desse programa é garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2009a). Além disso, destaca-se que na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) há a indicação de 12 fitoterápicos que são ofertados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) à população brasileira e, portanto, são prescritos por médicos (BRASIL, 2020). Soma-se a isso que o Ministério da Saúde possui a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o SUS (Renuis). Essa Relação conta com cerca de 70 espécies que estão em análise (BRASIL, 2009b). Logo, o SUS tem desenvolvido políticas públicas e regulamentações nacionais referente à utilização de remédios tradicionais de eficácia comprovada e a possível incorporação desses conhecimentos às atividades de atenção primária à saúde. Destaca-se ainda que o uso das plantas medicinais é vislumbrado como uma importante estratégia para o atendimento da Atenção Primária em Saúde pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef) (OMS, 1979; BRASIL, 2016). Assim, percebe-se o interesse governamental e profissional em associar o avanço tecnológico ao conhecimento popular e ao desenvolvimento sustentável visando uma política de assistência em saúde eficaz, abrangente, humanizada e independente da tecnologia farmacêutica naquilo que for possível. (FRANÇA *et al.*, 2008). Os esforços ainda são percebidos pela instituição da Portaria nº22/1967 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Resolução-RDC nº17/2000 que classifica os fitoterápicos como medicamentos (BRASIL, 2000).

Destaca-se ainda que, além do interesse governamental, a população tem grande adesão a esses produtos o que incrementou a sua comercialização, de modo que o Estado precisou regulamentar esse mercado ainda mais rápido quanto ao processo de registro e venda (FRANÇA *et al.*, 2008).

A adesão da população se deve à dois fatos importantes: (I) grande disponibilidade de espécies vegetais com efeitos medicinais e (II) costumes enraizados na cultura (ARAÚJO, 1981).

O uso das plantas medicinais no Brasil é facilitado devido a sua grande biodiversidade. Assim, as comunidades tradicionais do Brasil têm facilidade de acesso e ainda uma grande diversidade de opções à disposição. Assim, ao aliar a grande diversidade e conhecimento tradicional é possível desenvolver recursos terapêuticos fáceis e de baixo custo. Geralmente essa prática facilita a automedicação entre os moradores e reduzindo a procura por atendimento médico nos postos de saúde (ABÍLIO, 2011; BASSO; LOCATELLI, 2020). No entanto, a prática da automedicação gera preocupação (MELO *et al.*, 2021; XAVIER *et al.*, 2021) e precisa ser melhor debatida, inclusive no uso das plantas medicinais (BRITO *et al.*, 2020; DE CARLI *et al.*, 2019).

Habitualmente as pessoas acreditam que produtos naturais não são tóxicos e não fazem mal para a saúde. No entanto, esse é um erro que precisa ser esclarecido, visto que há muitas espécies que podem causar toxicidade ao organismo humano (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; MORGAN, 1982) e outras que podem, inclusive, interferir no efeito de medicamentos alopáticos (EISENBERG; DAVIS; ETTNER, 1998; SKENKEL, 1996).

2.2 *Piper glabratum*

A família Piperaceae distribui-se em cinco gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Potomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis* (PARMAR *et al.*, 1997). O gênero *Piper* possui mais de 2.000 espécies (KATO E FURLAN, 2007). As espécies brasileiras de *Piper* são de hábito arbustivo e possuem folhas simples alternas e ramos segmentados unidos por nós grossos (DYER; PALMER, 2004). Elas também possuem aroma característico que é exalado quando partes da planta são extirpados e/ou macerados (JARAMILLO; MANOS, 2001).

As espécies de *Piper* são popularmente conhecidas como pimenta, pariparobacaapeba, falso jaborandi, dentre outros (KATO E FURLAN, 2007). Elas são comercializadas como pimentas que é um importante condimento utilizado para temperar alimentos e, em especial, carnes, sendo que a presença do seu conteúdo oleífero tem aplicabilidade descrita na medicina, na indústria de alimentos, na produção de inseticidas, dentre outras (GUIMARÃES *et al.*, 2001; JUNQUEIRA *et al.*, 2007).

Piper nigrum (pimenta do reino) é a espécie mais conhecida, utilizada e estudada. Seus frutos são picantes e por isso um condimento muito apreciado na culinária. Quando os frutos são coletados maduros eles originam a pimenta branca e quando estão secos originam a pimenta preta mais comumente utilizada (BEZERRA *et al.*, 2007). *P. nigrum* está descrita como analgésica e antiinflamatória (TASLEEM *et al.*, 2014).

Em Mato Grosso do Sul, em especial na região de Dourados – MS, as espécies de Piper relatadas com uso popular são: *Piper aduncum* L., *Piper amalago* L. e *Piper umbellata* (L.) Miq. As folhas dessas plantas são utilizadas como analgésicas, anestésicas, para o tratamento de distúrbios gástricos e de queimaduras (ALVES *et al.*, 2008). Além dessas, a *Piper glabratum* também é uma espécie citada devido à sua atividade diurética (PRANDO *et al.*, 2014).

A literatura sobre a *P. glabratum* é muito escassa e apenas quatro artigos estão disponíveis (BRANQUINHO *et al.*, 2017; FLORES *et al.*, 2008; LEITÃO *et al.*, 2020; PRANTO *et al.*, 2014).

O primeiro artigo publicado de *P. glabratum* indicou que dentre os seus constituintes secundários havia nove derivados do ácido benzóico. Também foram identificados outros quatro compostos já descritos. Os produtos isolados foram testados *in vitro* quanto contra as formas promastigotas de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*. Entre os compostos avaliados, o metil 3,4-dihidroxi-5-(3'-metil-2'-butenil)benzoato apresentou efeito leishmanicida (IC₅₀ 13,8-18,5 µg/mL) contra as três cepas de *Leishmania* utilizadas, e o metil 3,4-dihidroxi-5-(2-hidroxi-3-metilbutenil)benzoato (1), metil 4-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)benzoato (3) e metil 3 O benzoato de ,4-dihidroxi-5-(3-metil-2-butenil) (7) apresentaram atividade tripanocida com valores de IC₅₀ de 16,4, 15,6 e 18,5 µg/mL, respectivamente (FLORA *et al.*, 2008).

O segundo artigo publicado sobre *P. glabratum* confirmou a sua indicação etnofarmacológica, visto que foi comprovado o seu efeito diurético. O extrato bruto e o composto isolado 2-metoxi-4,5-metilenodioxo-trans-cinamoil-pirrolidina foram administrados por via oral em ratos Wistar e avaliou-se a excreção urinária, pH, densidade, condutividade e conteúdo de Na(+), K(+), Cl(-) e HCO₃(-). Além disso, avaliou-se a toxicidade aguda do extrato bruto. Observou-se que o extrato bruto, se administrado intraperitonealmente, tem toxicidade hepática e induz mortalidade elevada. Por via oral, o extrato bruto pode induzir toxicidade aguda.

O composto isolado (30 mg/kg), por sua vez, aumentou o volume urinário, o pH e a excreção de HCO₃⁽⁻⁾. Esses resultados comprovam o efeito diurético do composto isolado de *P. glabratum* (PRANDO *et al.*, 2014).

O terceiro artigo comprovou que o óleo essencial das folhas de *P. glabratum* tem potencial anti-inflamatório e não induz danos no DNA. Nesse estudo avaliou-se a toxicidade aguda do óleo essencial em camundongos fêmeas nas doses únicas de 500, 1000, 2000 ou 5000mg/kg/peso corporal (via oral). No teste de toxicidade subaguda, as fêmeas receberam 500 ou 1000mg/kg/peso corporal do óleo essencial por 28 dias. Já o potencial anti-inflamatório foi avaliado pelos modelos de pleurisia, edema, hiperalgesia mecânica e alodinia fria em patas de camundongos. Os resultados demonstraram que não foram observados sinais clínicos de toxicidade nos animais após o tratamento agudo, o que sugere que a DL50 é superior a 5000mg/kg. A exposição subaguda ao óleo essencial não produziu alterações significativas nos parâmetros hematológicos ou bioquímicos. Da mesma forma, a histologia dos órgãos e o ciclo estral não apresentaram alterações marcantes. O óleo essencial exibiu atividade anti-inflamatória indicada pela inibição da migração leucocitária (100, 300, 700mg/kg) e do extravasamento de proteínas para o exsudato pleural (700mg/kg). Após injeção intraplantar de carragenina, observou-se que a dose de 700mg/kg de óleo essencial reduziu a formação de edema e diminuiu a sensibilidade à estimulação mecânica e ao frio. Estes resultados demonstraram o potencial anti-inflamatório do óleo essencial de folhas de *P. glabratum* (BRANQUINHO *et al.*, 2017).

Já o quarto e último trabalho encontrado na literatura pesquisada versa sobre o efeito analgésico e anti-inflamatório do extrato etanólico e frações de folhas de *P. glabratum* (EEPg). Para tanto, camundongos Swiss foram tratados com EEPG (30-300 mg/kg de peso corporal (p.c.)), com a fração hexânica (HXPG) (19,5 mg/kg de peso corporal) ou com a fração hidroetanólica (HAPG) (83,37 mg/kg de peso corporal) e, em seguida, submetidos a testes de pleurisia induzida por carragenina e edema de pata, dor espontânea e a inflamação intra-articular induzida por zymosan. Ratos Wistar foram tratados com EEPg para avaliar a toxicidade aguda. A análise fitoquímica das frações demonstrou a presença de fitol e mistura de estigmasterol e β-sitosterol nas frações. No teste de toxicidade aguda, LD50 acima de 2000 mg/kg b.w. foi observado. Os tratamentos reduziram o edema, a hiperalgesia ao frio e mecânica, a migração de leucócitos e a exsudação de proteínas.

Logo, demonstraram-se as propriedades anti-hiperalgésicas e anti-inflamatórias do EEPg e frações. Assim, sugere-se que os resultados de EEPg e HXPG possam estar relacionados, pelo menos em parte, à modulação dos mediadores inflamatórios por fitol, estigmasterol e β -sitosterol (LEITÃO *et al.*, 2020).

2.3 Teratogenicidade

A Teratologia contribuiu significativamente para a compreensão de como ocorrem as anormalidades congênitas em recém-nascidos. A partir desses estudos alguns termos foram cunhados e o principal deles é conceito de agente teratogênico ou teratógeno. Esses são definidos como toda e qualquer composto/substância/agente químico, agente físico ou biológico ou estado de deficiência que ocorrendo durante o desenvolvimento embrionário ou fetal que seja capaz de produzir alteração na estrutura ou função da progênie. Além disso, os agentes teratogênicos podem ainda induzir déficits neurocomportamentais, retardo do crescimento e morte intra-uterina (embrio ou fetoletalidade) (ADAMNS, 1989; BRIGGS *et al.*, 2012; CAMPESATO, 2005; DICKE, 1989; JUCHAU, 1989).

Segundo Campesato (2005), a teratogênese depende de quatro eventos principais que são o genótipo materno-fetal, o mecanismo específico de cada agente teratogênico, o estágio de desenvolvimento do conceito no momento da exposição e a relação dose-efeito.

Os agentes teratogênicos podem apresentar ações diretas ou indiretas que promovem uma cascata de alterações prejudicando a expressão gênica, a mitose, as interações extracelulares, a matriz extracelular, a síntese de macromoléculas como as enzimas, o pH, a osmolaridade, o crescimento e o amadurecimento tecidual, o aumento de morte celular e os processos epigenéticos incluindo as metilações, por exemplo. Assim, o organismo materno e/ou fetal pode responder por meio de erros de não-disjunção cromossômica ou clastogênese que resultam em anormalidades cromossômicas (numéricas ou estruturais, respectivamente), malformações estruturais, interrupção da nidadação, reabsorções, perdas pré e pós-implantacionais, aborto, embrio e fetoletalidade, retardo de crescimento intrauterino,

deteriorização funcional do neo-nato, alterações comportamentais e retardo mental (CAMPESATO, 2005; HOLLIDAY, 1998; LEWIN, 2001; MCELHATTON, 1999; ROGERS *et al.*, 2000; RUTLEDGE *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2009; WELSH, 1992).

As alterações genéticas são a causa mais comum de malformações congênitas. Em seres humanos representam cerca de um terço dos casos (MOORE; PERSUAD, 2004). A literatura cita ainda que aberrações cromossômicas correlacionam-se a 6-7% dos casos, genes mutantes de 7-8%, fatores ambientais de 7-10%, hereditariedade multifatorial de 20-25% e etiologia desconhecida somam de 50-60% (CONNOR; FERGUSON-SMITH, 1987; PERSAUD, 1990; THOMPSON *et al.*, 1991). No entanto, é possível que a maioria das crianças com etiologia desconhecida de malformação congênita tenha algum distúrbio genético (MOORE; PERSUAD, 2004).

Para que ocorram essas porcentagens um evento característico e importante é a disrupção. Disrupção são todos os eventos que causam interrupção do curso normal de um processo. Nesse contexto, diz-se que todos os agentes teratogênicos, em especial, os químicos podem funcionar como agentes disruptores. Assim, acredita-se que haja mais de 5 milhões de substâncias que entrarão em contato com o nosso organismo ao longo da nova vida. Estima-se que apenas 1.500 foram testadas quanto aos seus efeitos teratogênicos em modelos pré-clínicos e apenas 40 são comprovadamente teratogênicas para o homem (CAMPESATO, 2005; SHARDEIN, 2000).

Os estudos de teratogênese em humanos são muito difíceis porque existem muitos vieses que precisam ser controlados. Em geral, estudos com humanos são retrospectivos e se observa o que acontece com os filhos de mãe expostas acidentalmente a um agente. Além disso, esses estudos precisam contar com a idoneidade e boa memória da gestante/mãe. Destaca-se ainda que o organismo materno e fetal está exposto a um tão grande número de xenobióticos que é difícil determinar a causa da alteração/malformação (CAMPESATO, 2005; FERGUSON *et al.*, 1997; WELLS *et al.*, 1997).

Diante do exposto, é necessário lançar mão de modelos experimentais para a fazer as avaliações em teratogênese. No entanto, aqui reside um problema, visto que nem sempre os agentes teratogênicos para o homem o são para animais e vice-versa.

No entanto, para dirimir parte dessa questão a ANVISA (2013) e a OECD 421 (2015) regulamentaram a necessidade de se garantir segurança de uma dose 10x maior do que a dose de uso. Portanto, somente se essa dose for segura será possível

dar continuidade aos testes e avaliações para indicar o consumo do produto com baixo risco de teratogênese. Assim, a maioria dos estudos de teratologia são realizados em modelo pré-clínico de animais e servem como triagem para a verificação de potenciais agentes teratogênicos (CORDERO; OAKLEY, 1983; LAMMER *et al.*, 1895).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do extrato etanólico de *Piper glabratum* no desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal de camundongos Swiss.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do extrato etanólico de *Piper glabratum* sobre o desempenho reprodutivo por meio dos parâmetros estabelecidos para a condição.

Avaliar os efeitos do extrato etanólico de *Piper glabratum* sobre o desenvolvimento embriofetal por meio de ensaios de teratogênese.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal do extrato de *P. Glabratum*

Folhas de *P. Glabratum* Kunth foram coletadas em fevereiro de 2017 em Dourados – Mato Grosso do Sul (latitude 2.209'37, 7" sul e longitude 54055'03,2" oeste). A espécie foi identificada pela Profa. Elsie Franklin Guimarães do Jardim Botânico do Rio de Janeiro – RJ – Brasil e depositada (DDMS 4412) no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), MS, Brasil. A atividade de pesquisa está registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético – SisGen (nº AD5B086 and nºA3C3205). O preparado do extrato etanólico de *P. glabratum* foi conforme as instruções de Leite et al. (2020).

3.2 Animais

Foram utilizados 60 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* de ambos os sexos em idade reprodutiva, sendo 40 fêmeas com peso médio de 35g e 20 machos com peso médio de 36g. Todos os animais passaram por período de adaptação de 7 dias e foram alocados em mini-isoladores (*Rack* ventilada Alesco®), forrados com maravalha de *Pinus sp.*. Os machos foram mantidos isoladamente e as fêmeas em duplas por mini-isolador. Os animais foram alimentados com ração comercial padrão (Nuvital®) e água filtrada sob sistema de livre acesso. A luz foi controlada por fotoperíodo (12h claro/ 12h escuro), a temperatura mantida em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de 55 ± 10 . 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 número 965/2018.

3.3 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, 2014; David et al., 2014; Oliveira et al., 2015a; Ishikawa et al., 2018; Vani et al.,

2018a). Os animais prenhes foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais (n=10): Controle - os animais receberam o veículo do EEPg (Tween 80 – 1%) 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 EEPg 100, 1000 e 2000 - os animais receberam o EEPg nas doses de 100, 1000 e 2000mg/kg (p.c., v.o.), do 1º ao 18º d.g, respectivamente. A escolha da dose de 100mg/Kg foi a partir da dose efetiva descrita por Leite et al. (2020). A partir da dose efetiva, foi definida uma dose de 10x maior (1000 mg/kg) e uma dose 20x maior (2000 mg/kg), seguindo a recomendação dos guidelines da área (ANVISA, 2010; OECD - Test nº 423, 2001; OECD - Test nº 421, 2015).

3.4 Ensaios biológicos

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

Os fetos coletados foram pesados e passaram por análise sistemática de malformações externas e sexagem. A seguir 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. Posteriormente foram adicionadas quatro gotas de *Alizarina Red* 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 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 (Vani et al., 2018b) 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.

3.5 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 coração, pulmão, baço, rins e fígado.

3.6 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 *100 / n° de implantes), taxa de perdas pós implantacionais ($(n^{\circ}$ de implantes - n° de fetos vivos) *100 / n° de implantes), número de reabsorção, taxa de reabsorção (n° de reabsorções *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 *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 apresentarem 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 apresentarem 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 os pesos dos fetos individualmente e Oliveira et al. (2009) classifica a ninhada de forma geral.

3.7 Análise estatística

Foi utilizado o teste ANOVA/Tukey 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 $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

(Resultados apresentados em formato de artigo)

Artigo : O extrato etanólico de *Piper glabratum* é teratogênico e interfere no processo de ossificação de fetos de camundongos *Swiss*

Rogério Carlos Sanfelice Nunes^{a,b}; Fabricia Rodrigues Salustriano^a; Silvia Cordeiro das Neves^{a,b}, Marcelo Luiz Brandão Vilela^c, Valter Aragão do Nascimento^b, Arunachalam Karuppusamy^{a,b}, Roberto da Silva Gomes^d, Candida Aparecida Leite Kassuya^e, Jonas da Silva Mota^f; Rodrigo Juliano Oliveira^{a,b}.

^aCentro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen), Faculdade de Medicina Dr. Hélio Mandetta (FAMED), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

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

^cFaculdade de Medicina Dr. Hélio Mandetta (FAMED), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

^dDepartment of Pharmaceutical Sciences, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, 58102, United States.

^eFaculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, Brasil.

^fDepartamento de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados, MS, Brasil.

Resumo

Piper glabratum é uma planta usada tradicionalmente para o tratamento da dor e da inflamação. Essa planta é consumida inclusive por gestantes. Assim, avaliou-se os efeitos do extrato etanólico das folhas de *P. glabratum* (EEPg) no desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal de camundongos Swiss. Fêmeas prenhez foram tratadas com 100, 1.000 e 2.000mg/Kg durante todo o período gestacional por gavagem (v.o). O grupo controle recebeu água destilada na proporção de 0,1mL/10g (v.o.). Os resultados demonstraram que o EEPg tem baixo potencial maternotóxico e não altera o desempenho reprodutivo de fêmeas. No entanto, alterou o desenvolvimento embriofetal e causou redução do peso fetal (aumentando a frequência de fetos pequenos para a idade gestacional) nas duas maiores doses. Além disso, interferiu no peso placentário, no índice placentário e na eficiência placentária. A frequência de malformações viscerais aumentou em 2,8x para a menor dose de EEPb e as malformações viscerais aumentaram em 2,48x, 1,89x e 2,11x para as doses de 100, 1.000 e 2.000 mg/Kg de EEPb, respectivamente. Destaca-se que 100% das proles tratadas com EEPb apresentaram alteração no processo de ossificação. Assim, considera-se que o EEPB tem baixo potencial materno tóxico, não altera o desempenho reprodutivo de fêmeas. Mas, é teratogênico e interfere, principalmente, no processo de ossificação e por isso o seu uso é contra-indicado no período gestacional.

Palavras-chaves: Piperaceae, planta medicinal, malformação, osso, desenvolvimento embriofetal

1. Introdução

O gênero *Piper*, pertencente à família Piperaceae, é conhecido popularmente como “pimenta”, “pariparoba caapeba” e “falso jaborandi” (Kato e Furlan, 2007; Prando et al., 2014; Branquinho et al., 2017; Leitão et al., 2020). Esse gênero tem cerca de 2.000 espécies distribuídas geograficamente nas regiões tropicais e subtropicais (Dyer; Palmer, 2004; Prando et al., 2014; Branquinho et al., 2017). Geralmente, essas plantas são arbustivas com folhas simples alternas e com ramos segmentados unidos por nós (Dyer; Palmer, 2004).

Uma das espécies desse gênero é a *Piper glabratum* Kunth. Essa espécie com ocorrência no Mato Grosso do Sul, Brasil, é utilizada popularmente, nesse estado, para o tratamento de dor e inflamação (Leitão et al., 2020).

Estudos sobre essa espécie são bem restritos. No entanto, Branquinho et al. (2017) comprovou a indicação etnofarmacológica dessa planta por demonstrar os efeitos antiinflamatórios do óleo essencial das folhas de *P. glabratum*. Mais tarde, Leitão et al. (2020) também demonstrou os efeitos antihiperalgésico e antiinflamatório do extrato etanólico das folhas dessa mesma espécie e também da fração hexânica, principalmente.

Para essa espécie ainda está descrita a atividade antiparasitária contra *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi* (Flores et al., 2008). A literatura também registra que extrato metanólico das raízes de *P. glabratum* tem efeito diurético e pode ser hepatotóxico em ratos *Wistar* quando usado em altas doses pela via intraperitoneal (Prando et al., 2014). Ainda de acordo com Prando et al. (2014) a DL₅₀ por via oral é superior a 3.000mg/Kg (para machos e fêmeas) e por via intraperitoneal é de 2.426,216mg/Kg para fêmeas e superior a 3.000mg/Kg em machos.

De acordo com Branquinho et al. (2017) os olhos essenciais das folhas de *P. glabratum* não possui toxicidade aguda até a dose de 5.000mg/Kg e nem toxicidade subaguda até a dose de 1.000mg/Kg em camundongos *Swiss* fêmeas. Já de acordo com Leitão et al. (2020) a DL₅₀ em ratos *Wistar* é superior a 2.000mg/Kg para o extrato etanólico das folhas. No entanto, os animais apresentaram sinais de depressão do sistema nervoso central, como sonolência, nas primeiras 6h após o tratamento com o extrato etanólico.

Ainda de acordo com o Leitão et al. (2020), o fracionamento cromatográfico da fração hexânica demonstrou a presença de Fitol e uma mistura de Estigmasterol e β -sitosterol. Já a fração hidroalcoólica indicou a presença de flavonóis glicosilados. O extrato bruto estudo por Leitão et al., (2020), que tem efeito antihiperalgésico e antiinflamatório, foi o mesmo testado na presente pesquisa.

Essa planta medicinal é utilizada também por gestantes em Mato Grosso do Sul o que demonstra a necessidade de se avaliar os seus efeitos durante o período gestacional. Diante do exposto a presente pesquisa teve por objetivo avaliação os efeitos do extrato etanólico de *Piper glabratum* no desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal de camundongos *Swiss*.

2. Material e Métodos

2.1 Material Vegetal do Extrato de *P. Glabratum*

Folhas de *P. Glabratum* Kunth foram coletadas em fevereiro de 2017 em Dourados – Mato Grosso do Sul (latitude 2.209’37, 7” sul e longitude 54055’03,2” oeste). A espécie foi identificada pela Profa. Elsie Franklin Guimarães do Jardim Botânico do Rio de Janeiro – RJ – Brasil e depositada (DDMS 4412) no herbário da

Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), MS, Brasil. A atividade de pesquisa está registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético – SisGen (nº AD5B086 and nºA3C3205). O preparado do extrato etanólico de *P. glabratum* foi conforme as instruções de Leite et al. (2020).

2.2 Animais

Foram utilizados 60 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* de ambos os sexos em idade reprodutiva, sendo 40 fêmeas com peso médio de 35g e 20 machos com peso médio de 36g. Todos os animais passaram por período de adaptação de 7 dias e foram alocados em mini-isoladores (*Rack* ventilada Alesco®), forrados com maravalha de *Pinus sp.*. Os machos foram mantidos isoladamente e as fêmeas em duplas por mini-isolador. Os animais foram alimentados com ração comercial padrão (Nuvital®) e água filtrada sob sistema de livre acesso. A luz foi controlada por fotoperíodo (12h claro/ 12h escuro), a temperatura mantida em $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de 55 ± 10 . 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 número 965/2018.

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, 2014; David et al., 2014; Oliveira et al., 2015a; Ishikawa et al., 2018; Vani et al., 2018a). Os animais prenhes foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais (n=10): Controle - os animais receberam o veículo do EEPg (Tween 80 – 1%) 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 EEPg 100, 1000 e 2000 - os animais receberam o EEPg nas doses de 100, 1000 e 2000mg/kg (p.c., v.o.), do 1º ao 18º d.g, respectivamente. A escolha da dose de 100mg/Kg foi a partir da dose efetiva descrita por Leite et al. (2020). A partir da dose efetiva, foi definida uma dose de 10x maior (1000 mg/kg) e uma dose 20x maior (2000 mg/kg), seguindo a recomendação dos guidelines da área (ANVISA, 2010; OECD - Test nº 423, 2001; OECD - Test nº 421, 2015).

2.4. Ensaios biológicos

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

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 (Vani et al., 2018b) 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 calculados conforme os dados do peso inicial (fêmeas pesadas no dia zero), peso final (fêmeas pesadas no 18^o 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 coração, pulmão, baço, rins e fígado.

2.6. Desempenho reprodutivo e desenvolvimento embrionário

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 *100 / n° de implantes), taxa de perdas pós implantacionais ($(n^{\circ}$ de implantes - n° de fetos vivos) *100 / n° de implantes), número de reabsorção, taxa de reabsorção (n° de reabsorções *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 *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 apresentarem 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 apresentarem 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 os pesos dos fetos individualmente e Oliveira et al. (2009) classifica a ninhada de forma geral.

2.7 Análise estatística

Foi utilizado o teste ANOVA/Tukey 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

O peso inicial e o ganho de peso líquido não variaram entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Já o peso final, o ganho de peso e o peso do útero aumentaram ($p < 0,05$) no grupo EEPg 100 em relação aos grupos EEPg 1000 e EEPg 2000. Porém EEPg 100 e o grupo Controle não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$) (Tabela 01).

O peso absoluto do coração, pulmões, fígado, rins e baço e o peso relativo do coração, rins e baço não diferiram ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais. No entanto, o peso relativo do pulmão aumentou ($p < 0,05$) nos grupos EEPg 1000 e EEPg 2000 em comparação aos grupos Controle e EEPg 100. Já o peso relativo do fígado aumentou ($p < 0,05$) EEPg 2000 em relação aos outros grupos experimentais (Tabela 02).

Tabela 1. Valores médios \pm erro padrão da média dos parâmetros biométricos das fêmeas tratadas com o extrato etanólico de *P. glabratum* (EEPg).

Grupos Experimentais	Parâmetros biométricos (g)				
	Peso Inicial	Peso Final	Ganho de Peso	Peso do útero	Ganho de Peso Líquido
Controle	36,56 \pm 1,31 ^a	53,72 \pm 1,47 ^{a,b}	17,16 \pm 1,93 ^{a,b}	17,65 \pm 1,28 ^{a,b}	- 0,50 \pm 1,31 ^a
EEPg 100	35,42 \pm 2,00 ^a	55,97 \pm 1,42 ^b	20,55 \pm 1,27 ^b	18,95 \pm 0,48 ^b	1,60 \pm 1,10 ^a
EEPg 1000	34,51 \pm 1,00 ^a	48,62 \pm 1,75 ^a	14,28 \pm 2,03 ^a	14,40 \pm 1,49 ^a	- 0,11 \pm 0,98 ^a
EEPg 2000	35,04 \pm 2,01 ^a	47,73 \pm 1,92 ^a	12,69 \pm 1,11 ^a	14,11 \pm 1,03 ^a	- 1,42 \pm 0,78 ^a

Legenda: g – gramas. EEPg 100 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 100 mg/Kg; EEPg 1000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 1000 mg/Kg; EEPg 2000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 2000 mg/Kg. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Média + Erro padrão da média (Teste Estatístico: Anova/Tukey; $p < 0,05$).

Tabela 2. Valores médios \pm erro padrão da média dos pesos absolutos e relativos dos órgãos das fêmeas tratadas com o extrato etanólico de *P. glabratum* (EEPg).

Peso Absoluto dos órgãos (g)					
Grupos Experimentais	Coração	Pulmão	Fígado	Rins	Baço
Controle	0,20 \pm 0,01 ^a	0,25 \pm 0,01 ^a	2,44 \pm 0,11 ^a	0,44 \pm 0,02 ^a	0,19 \pm 0,02 ^b
EEPg 100	0,18 \pm 0,01 ^a	0,23 \pm 0,01 ^a	2,45 \pm 0,04 ^a	0,42 \pm 0,02 ^a	0,17 \pm 0,02 ^{a,b}
EEPg 1000	0,18 \pm 0,01 ^a	0,27 \pm 0,01 ^a	2,37 \pm 0,06 ^a	0,41 \pm 0,03 ^a	0,13 \pm 0,01 ^{a,b}
EEPg 2000	0,17 \pm 0,01 ^a	0,26 \pm 0,01 ^a	2,62 \pm 0,07 ^a	0,39 \pm 0,02 ^a	0,12 \pm 0,01 ^a

Peso Relativo dos órgãos					
Grupos Experimentais	Coração	Pulmões	Fígado	Rins	Baço
Controle	0,0037 \pm 0,0002 ^a	0,0047 \pm 0,0001 ^a	0,045 \pm 0,0018 ^a	0,0081 \pm 0,0003 ^a	0,0036 \pm 0,0004 ^a
EEPg 100	0,0032 \pm 0,0001 ^a	0,0041 \pm 0,0002 ^a	0,044 \pm 0,0009 ^a	0,0075 \pm 0,0002 ^a	0,0030 \pm 0,0004 ^a
EEPg 1000	0,0038 \pm 0,0003 ^a	0,0056 \pm 0,0003 ^b	0,049 \pm 0,0015 ^a	0,0085 \pm 0,0006 ^a	0,0027 \pm 0,0002 ^a
EEPg 2000	0,0035 \pm 0,0001 ^a	0,0054 \pm 0,0002 ^b	0,055 \pm 0,0019 ^b	0,0083 \pm 0,0003 ^a	0,0025 \pm 0,0002 ^a

Legenda: g – gramas. EEPg 100 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 100 mg/Kg; EEPg 1000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 1000 mg/Kg; EEPg 2000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 2000 mg/Kg. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Média + Erro padrão da média (Teste Estatístico: Anova/Tukey; $p < 0,05$).

3.2. Desempenho reprodutivo

O número de fêmeas prenhes, implantes, fetos vivos e mortos, e reabsorção bem como a viabilidade fetal, a taxa de perdas pós-implantacionais, a taxa de reabsorção e razão sexual não variaram ($p > 0,05$) entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 03).

Tabela 3. Valores médios \pm erro padrão da média dos parâmetros relativos ao desempenho reprodutivo das fêmeas tratadas com o extrato etanólico de *P. glabratum* (EEPg).

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	EEPg 100	EEPg 1000	EEPg 2000
Número de fêmeas prenhes	10	10	10	10
Implantes	13,50 \pm 1,07 ^a	14,40 \pm 0,34 ^a	12,89 \pm 1,41 ^a	13,10 \pm 1,08 ^a
Fetos Vivos	12,10 \pm 0,90 ^a	13,20 \pm 0,44 ^a	11,22 \pm 1,36 ^a	11,10 \pm 0,85 ^a
Fetos Mortos	0,10 \pm 0,10 ^a	0,30 \pm 0,15 ^a	0,11 \pm 0,11 ^a	0,10 \pm 0,10 ^a
Viabilidade Fetal	90,85 \pm 3,28 ^a	91,80 \pm 2,69 ^a	88,40 \pm 4,97 ^a	85,62 \pm 2,96 ^a
Reabsorção	1,30 \pm 0,52 ^a	1,00 \pm 0,37 ^a	1,56 \pm 0,73 ^a	1,90 \pm 0,53 ^a
TPPI	9,15 \pm 3,28 ^a	8,20 \pm 2,69 ^a	11,60 \pm 4,97 ^a	14,38 \pm 2,96 ^a
TR	8,56 \pm 3,28 ^a	6,82 \pm 2,50 ^a	10,86 \pm 4,87 ^a	13,79 \pm 3,08 ^a
Razão Sexual	1,43 \pm 0,16 ^a	2,68 \pm 1,03 ^a	2,32 \pm 1,00 ^a	1,11 \pm 0,23 ^a

Legenda: TPPI – Taxa de perdas pós-implantacionais; TR – Taxa de reabsorção. EEPg 100 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 100 mg/Kg; EEPg 1000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 1000 mg/Kg; EEPg 2000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de

2000 mg/Kg. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significativas. Média + Erro padrão da média (Teste Estatístico: Anova/Tukey; $p > 0,05$).

3.4. Desenvolvimento embrio-fetal

O peso fetal reduziu ($p < 0,05$) nos grupos EEPg 1000 e EEPg 2000 o que conseqüentemente levou ao aumento ($p < 0,05$) do número de fetos classificados como pequenos para a idade gestacional (SPA). O peso placentário reduziu ($p < 0,05$) no grupo EEPg 100 em relação aos demais grupos experimentais. Para esse mesmo grupo observou-se redução ($p < 0,05$) do índice placentário e aumento ($p < 0,05$) da eficiência placentária. Observou-se ainda aumento do índice placentário para o grupo EEPg 2000 em relação aos grupos Controle e EEPg 100 (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios \pm erro padrão da média dos parâmetros relativos ao desenvolvimento embriofetal das fêmeas tratadas com o extrato etanólico de *P. glabratum* (EEPg).

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	EEPg 100	EEPg 1000	EEPg 2000
Peso Fetal*	1,12 \pm 0,11 ^b	1,13 \pm 0,12 ^b	1,02 \pm 0,17 ^a	1,02 \pm 0,01 ^a
Peso da Placenta	0,075 \pm 0,002 ^b	0,075 \pm 0,001 ^b	0,059 \pm 0,002 ^a	0,075 \pm 0,001 ^b
Índice Placentário	0,067 \pm 0,001 ^b	0,067 \pm 0,001 ^b	0,059 \pm 0,002 ^a	0,076 \pm 0,002 ^c
Eficiência Placentária	15,77 \pm 0,35 ^a	15,61 \pm 0,27 ^a	19,32 \pm 0,73 ^b	14,23 \pm 0,40 ^a
PIG	3,31%	6,11%	32,67%*	24,32%*
AIG	92,56%	91,60%	62,38%	74,77%
GIG	4,13%	2,29%	4,95%	0,90%
APIP		PAIP	PAIP	PAIP

Legenda: CPFID (Soulimane-Mokhtari et al., 2005) - classificação do peso fetal segundo a idade gestacional; PIG – pequeno para idade gestacional; AIG; adequado para idade gestacional; GIG – grande para idade gestacional. APIP (Oliveira et al., 2009) - adequação do peso a idade de prenhez; PAIP - fetos com peso adequado para a idade de prenhez. EEPg 100 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 100 mg/Kg; EEPg 1000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 1000 mg/Kg; EEPg 2000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 2000 mg/Kg. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. Média + Erro padrão da média (Teste Estatístico: Anova/Tukey; $p < 0,05$).

As malformações externas observadas nos diferentes grupos experimentais foram Hidropsia, cifose, hiperflexão e hiperextensão de membro anterior e posterior unilateral, hiperflexão e hiperextensão de membro posterior bilateral, pata pequena e cauda dobrada. A frequência de fetos malformados e a porcentagem de malformações não variou ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais, exceto para a frequência de cifose que ocorreu mais ($p < 0,05$) no grupo EEPg 100 em relação ao grupo controle (Tabela 05).

Tabela 5. Número absolutos e porcentagem de malformações externas encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico de *P. glabratum* (EEPg).

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	EEPg 100	EEPg 1000	EEPg 2000
Análise Externa				
Fetos Analisados	121	131	101	111
Fetos Normais	106	109	94	100
%	87,60	83,21	93,07	90,10
Hidropsia	0	0	0	1
%	0,00	0,00	0,00	0,90
Cifose	1	10*	1	4
%	0,83	7,63	0,99	3,60
Hiperflexão de membro anterior unilateral	1	3	1	0
%	0,83	2,29	0,99	0,00
Hiperflexão de membro posterior unilateral	0	1	3	1
%	0	0,76	2,97	0,90
Hiperflexão de membro posterior bilateral	0	0	1	1
%	0,00	0,00	0,99	0,90
Hiperextensão de membro anterior unilateral	2	1	1	0
%	1,65	0,76	0,99	0,00
Hiperextensão de membro posterior unilateral	7	2	0	0
%	5,79	1,53	0,00	0,00
Hiperextensão de membro posterior bilateral	0	1	0	0
%	0,00	0,76	0,00	0,00
Pata pequena	0	2	0	1
%	0,00	1,53	0,00	0,90
Cauda dobrada	4	2	0	2
%	3,31	1,53	0,00	1,80
Frequência de malformação externa	15	22	12	11
% malformação externa	12,40	16,79	6,93	9,90

Legenda: % - Porcentagem de fetos com malformações. EEPg 100 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 100 mg/Kg; EEPg 1000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 1000 mg/Kg; EEPg 2000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 2000 mg/Kg. *Diferença

estatisticamente significativa em relação ao Controle. Números absolutos (Teste Estatístico: Quiquadrado; $p < 0,05$).

As malformações viscerais observadas foram hidrocefalias de graus leve, moderado e severo, hiperplasia de coana, língua bifurcada, aumento da câmara ventricular (coração). Nas análises individuais das malformações observou-se aumento ($p < 0,05$) da frequência de hidrocefalia moderada no grupo EEPg 2000 em relação ao controle. Para todas as outras malformações não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$). No entanto, observou-se aumento ($p < 0,05$) de 2,8x da frequência global de malformações no grupo EEPg 100 em relação ao grupo Controle. A porcentagem de fetos malformados foi de 18,87%, 45,16%, 16,42% e 33,33% para os grupos Controle, EEPg 100, EEPg 1000 e EEPg 2000, respectivamente (Tabela 06).

Tabela 6. Número absolutos e porcentagem de malformações viscerais encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico de *P. glabratum* (EEPg).

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	EEPg 100	EEPg 1000	EEPg 2000
Análise Visceral				
Fetos Analisados	53	62	53	45
Fetos Normais	43	34	39	30
%	81,13	54,84	73,58	66,67
Hidrocefalia grave	1	2	2	1
%	1,89	3,23	3,77	2,22
Hidrocefalia moderada	0	3	3	6*
%	0,00	4,84	5,66	13,33
Hidrocefalia leve	9	18	8	8
%	16,98	29,03	15,09	17,78
Hiperplasia de coana	0	1	0	0
%	0,00	1,61	0,00	0,00
Língua Bifurcada	0	2	0	0
%	0,00	3,23	0,00	0,00
Câmara ventricular aumentada	0	2	1	0
%	0,00	3,23	1,89	0,00
Frequência de malformação visceral	10	28*	14	15
% malformação visceral	18,87	45,16	16,42	33,33

Legenda: % - Porcentagem de fetos com malformações. EEPg 100 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 100 mg/Kg; EEPg 1000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 1000 mg/Kg; EEPg 2000 – Extrato etanólico de Piper glabratum na dose de 2000 mg/Kg. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle. Números absolutos (Teste Estatístico: Quiquadrado; $p < 0,05$).

As malformações esqueléticas observadas na cabeça foram agenesia de interparietal e orbitotransfenoide direito, e ossificação reduzida do frontal, interparietal, maxilar, nasal, parietal, premaxilar, supra occipital e zigomático. No tronco observou-

se agenesia do centro esternébrio e processo xifoide, artrogripose, centro esternébrio em formato de halter, costela bifurcada, hipercifose, hipercifose com anteriorização da cabeça, ossificação reduzida da costela, do esternébrio e do processo xifoide e torção dos centros vertebrais. Nos membros observou-se agenesia de falanges, de metacarpo unilateral, e agenesia do arco caudal e alteração do núcleo de ossificação do joelho e cotovelo (Tabela 7).

Observou-se aumento ($p < 0,05$) da frequência de ossificação reduzida do frontal, interparietal, nasal, parietal e supra occipital nos grupos tratados com EEPg em relação ao grupo Controle. Também se observou aumento ($p < 0,05$) da frequência de centro esternébrio em formato de halter para esses mesmos grupos em relação ao Controle (Tabela 07).

Também se observou aumento ($p < 0,05$) da frequência de ossificação reduzida do esternébrio e de agenesia de falange para os grupos EEPg 1000 e EEPg 2000 em relação ao grupo Controle. Já o aumento ($p < 0,05$) de agenesia do centro esternébrio foi observado somente para o grupo EEPg 1000 em relação ao grupo Controle (Tabela 07).

Uma análise global das frequências de malformações esquelética demonstrou aumento ($p < 0,05$) de 2,8x, 1,89x e de 2,11x para os grupos EEPg 100, EEPg 1000 e EEPg 2000 em relação ao grupo Controle, respectivamente. A porcentagem de fetos malformados foi de 47,37% para o grupo Controle e de 100% para os grupos tratados com EEPg (Tabela 07).

Tabela 7. Número absolutos e porcentagem de malformações esqueléticas encontradas na prole de fêmeas tratadas com o extrato etanólico de *P. glabratum* (EEPg).

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	EEPg 100	EEPg 1000	EEPg 2000
Análise Esquelética				
Fetos Analisados	57	67	51	57
Fetos Normais	30	0	0	0
%	52,63	0,00	0,00	0,00
Cabeça				
Agnesia de Interparietal	1	0	0	0
%	1,75	0,00	0,00	0,00
Agnesia de orbitotransfenoide direito	1	0	0	0
%	1,75	0,00	0,00	0,00
OR Frontal	0	16*	40*	57*
%	0,00	23,88	78,43	100,00
OR Interparietal	3	43*	31*	46*
%	5,26	64,18	60,78	80,7
OR Maxilar	0	2	0	0
%	0,00	2,99	0,00	0,00
OR Nasal	2	43*	50*	57*
%	3,51	64,18	98,04	100,00
OR Parietal	2	43*	48*	57*

%	3,51	64,18	94,12	100,00
OR Premaxilar	0	2	2	0
%	0,00	2,99	3,92	0,00
OR Supra occipital	0	15*	7*	10*
%	0,00	22,39	13,73	17,54
OR Zigomático	0	2	0	0
%	0,00	2,99	0,00	0,00
Tronco				
Agenesia de centro esternébrio	0	1	6*	5
%	0,00	1,49	11,76	8,77
Agenesia de Processo Xifoide	1	0	0	0
%	1,75	0,00	0,00	0,00
Artrogripose	0	0	0	1
%	0,00	0,00	0,00	1,75
Centro esternébrio em formato de halter	9	34*	20*	21*
%	15,79	50,75	39,22	36,84
Costela bifurcada	0	0	0	1
%	0,00	0,00	0,00	1,75
Hipercifose	0	1	0	0
%	0,00	1,49	0,00	0,00
Hipercifose com anteriorização da cabeça	0	1	0	0
%	0,00	1,49	0,00	0,00
OR Costela	0	0	0	2
%	0,00	0,00	0,00	3,51
OR Esternébrio	6	12	19*	16*
%	10,53	17,91	37,25	28,07
OR Processo Xifoide	0	2	3	3
%	0,00	2,99	5,88	5,26
Rotação dos corpos vertebrais	0	1	0	5
%	0,00	1,49	0,00	8,77
Membros				
Agenesia de falange	1	2	17*	15*
%	1,75	2,99	33,33	26,32
Agenesia de metacarpo unilateral	1	0	0	0
%	1,75	0,00	0,00	0,00
Agenesia do arco caudal	0	0	0	2
%	0,00	0,00	0,00	3,51
Alteração do núcleo de ossificação do joelho e cotovelo	0	0	0	2

%	0,00	0,00	0,00	3,51
Frequência de malformação esquelética	27	67*	51*	57*
% malformação esquelética	47,37	100	100	100

Legenda: % - Porcentagem de fetos com malformações; OR – Ossificação Reduzida. EEPg 100 – Extrato etanólico de *Piper glabratrum* na dose de 100 mg/Kg; EEPg 1000 – Extrato etanólico de *Piper glabratrum* na dose de 1000 mg/Kg; EEPg 2000 – Extrato etanólico de *Piper glabratrum* na dose de 2000 mg/Kg. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle. Números absolutos (Teste Estatístico: Quiquadrado; $p < 0,05$).

4. Discussão

O uso das plantas medicinais é uma importante estratégia para o atendimento da Atenção Primária em Saúde e em consonância com Organização Mundial da Saúde e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef), o Sistema Único de Saúde (SUS) tem desenvolvido políticas públicas e regulamentações nacionais referente à utilização de remédios tradicionais de eficácia comprovada e a possível incorporação desses conhecimentos às atividades de atenção primária à saúde (Brasil, 2016; Brasil, 2017).

Atualmente, a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse para o SUS (Rennisus) conta com cerca de 70 espécies que estão em análise (Brasil, 2009). No entanto, as populações brasileiras, em especial aquelas longe dos grandes centros e que possuem dificuldade de acesso a tratamentos, fazem o uso contínuo de outras espécies. *P. glabratum* não consta na relação Rennisus. No entanto, essa planta é utilizada para o tratamento de dor e inflamação segundo a medicina tradicional de Mato Grosso do Sul (Leitão et al., 2020) por diferentes populações incluindo as gestantes.

A indicação etnofarmacológica dessa planta já foi comprovada (Branquinho et al., 2017; Leitão et al., 2020). No entanto, não há nenhum registro de segurança de seu uso no período gestacional. Esse fato demonstra o ineditismo, o pioneirismo e a necessidade desse estudo.

Os nossos dados indicam que o EEPg tem baixo potencial maternotóxico visto que não alterou de forma importante parâmetros biométricos e o peso relativo e absoluto dos órgãos. Observou-se discreta redução do peso final, do ganho de peso e do peso do útero dos animais tratados com a menor dose de EEPg (100 mg/Kg). Observou-se ainda redução do peso absoluto do baço. Mas, essa diferença não foi mantida na avaliação do peso relativo. Assim, infere-se que essa diferença não se deva ao tratamento. Mas, sim ao tamanho dos animais. Foi observado também aumento do peso dos pulmões para as duas maiores doses de EEPg (1000 e 2000 mg/Kg) e do fígado para a maior dose (2000 mg/Kg). Esses resultados sugerem atenção.

Apesar de usar outra espécie, Leitão et al. (2020) relatou que a 2.000 mg/Kg em ratos *Wistar* não causou morte ou sinais de toxicidade no teste de toxicidade aguda. Destaca-se ainda que esses animais não apresentaram alterações nos parâmetros hipocráticos observados, como piloereção, lacrimejamento, alterações nas membranas mucosas, olhos ou fezes, ou resposta motora induzida tais como tremores, irritabilidade, contorção, convulsões e alterações na respiração. Na análise macroscópica de órgãos, nenhuma alteração (cor, tamanho e textura) foi observada em relação ao grupo controle. No nosso estudo realizamos as mesmas avaliações e

também não encontramos alterações ao longo dos dezoito dias consecutivos de tratamento (correspondente ao período gestacional). Salientamos que o extrato utilizado por Leitão et al. (2020) e o utilizado nesse estudo é o mesmo. Além disso, destacamos que esses sinais relatados anteriormente são importante indicativos de toxicidade (OECD 2008).

O EEPg não alterou o desempenho reprodutivo visto que não foi observada nenhuma alteração no número de fêmeas prenhez, no número de implantações, fetos vivos e mortos, reabsorções e nem nas taxas de perdas pós-implantacionais, taxa de reabsorção, viabilidade fetal e razão sexual. Esses parâmetros são os considerados pela literatura da área para predizer o possível efeito deletério de extratos e/ou compostos no desempenho de fêmeas (Cruz et al., 2022; Ishikawa et al., 2018; Pessatto et al., 2017; Sene et al., 2021; Vani et al., 2018a; Vani et al., 2018b). No entanto, o EEPg alterou o desenvolvimento embriofetal.

O EEPg reduziu o peso placentário para as duas maiores doses (1.000 e 2.000 mg/Kg). No entanto, essa redução levou a alterações distintas em outros parâmetros. A redução do peso fetal na dose de 1.000mg/Kg está associada à redução do peso placentário, redução do índice placentário e aumento da eficiência. Já redução do peso fetal na dose de 2.000mg/Kg está associada ao aumento do índice placentário sem interferir no peso da placenta e na eficiência placentária. Esses fatos resultaram no aumento de fetos classificados como pequeno para a idade gestacional de acordo (Soulimane-Mokhtari et al., 2005). O que indica um importante efeito desse extrato no desenvolvimento embriofetal.

O EEPg também apresentou efeito teratogênico o que corrobora as alterações relatadas anteriormente para o desenvolvimento embriofetal. As malformações externas não diferiram entre os grupos. No entanto, o grupo tratado com a menor dose (EEPg 100) teve uma frequência total de malformações superior àquela observada para o grupo controle e para as outras doses. Esse fato é importante e requer atenção. No entanto, esperava-se uma relação dose-resposta, ou seja, à medida que ocorreu o aumento da dose de EEPg deveria ocorrer aumento da frequência de malformações até se atingir um platô onde todos os fetos estivessem malformados ou fossem a óbito e seriam computados como perdas pós-implantacionais. Porém, isso não foi verificado, ou seja, mesmo com aumento da dose de EEPb não ocorreu aumento nem de malformações e nem aumento das taxas de perdas pós-implantacionais. De acordo com o presente delineamento, esse fato não pode ser totalmente elucidado. Mas, um fato que chamou a atenção é que a maior frequência de malformações é do tipo de hidrocefalia de grau leve. Esse tipo de malformação pode regredir ao nascimento e pode ser detectada em proles de mães que tiveram a gestação interrompida precocemente. Assim, fetos coletados prematuramente podem apresentar essas variantes da normalidade (Oliveira et al., 2015; Ishikawa et al., 2018; Vani et al., 2018). Nós coletamos os fetos no 18º dia gestacional, que apesar de ser precoce visto que a gestação pode durar até o 21º dia gestacional, é o dia recomendado pela literatura especializada (Oliveira et al., 2015; Ishikawa et al., 2018; Vani et al., 2018).

Em relação às malformações esqueléticas observou-se que, de forma geral, 47% dos fetos do grupo controle apresentavam uma ou mais malformações. Em geral, essas podem ser consideradas variantes da normalidade e, em especial, porque a gestação foi interrompida precocemente e é de conhecimento que os últimos dias e as últimas horas gestacionais são cruciais para o avanço do processo de ossificação. Em geral, essas variantes da normalidade são ossificações reduzidas e, em especial de falanges (David et al., 2014; Gonçalves et al., 2013). No entanto, no presente experimento 100% das proles tratadas com o EEPb apresentaram atraso no processo

de ossificação e esse fato é muito importante e indica efeito teratogênico inclusive com a agenesia de ossos tais como interparietal, orbitotransfernoide, de esternóbrios, do processo xifoide e de falanges. Excetuando a agenesia de falanges, as outras agenesias não são descritas como variantes da normalidade.

Frente ao exposto considera-se que o EEPb tem baixo potencial maternotóxico, não altera o desempenho reprodutivo. Porém, tem potencial teratogênico. O efeito teratogênico foi evidenciado principalmente pela interferência no processo ossificação. Logo, o EEPb é contraindicado para uso durante a gestação.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, FUNDECT, CAPES e UFMS.

5. Referências

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília.

Barrow, M.V., Taylor, W.J., 1969. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J. Morphol.* 127, 291–305. doi:10.1002/jmor.1051270303

Branquinho, L. S., Santos, J. A., Cardoso, C. A. L., da Silva Mota, J., Junior, U. L., Kassuya, C. A. L., & Arena, A. C. (2017). Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 372-378.

Brasil. (2017). Plantas Medicinais e fitoterápicos no SUS. Ministério da Saúde. Acesso em 30/07/2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/daf/pnpmf/plantas-medicinais-e-fitoterapicos-no-sus>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em http://https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf

Cruz, L. L., Silva, B. S. F., Araujo, G. G., Leal-Silva, T., Paula, V. G., Souza, M. R., ... & Volpato, G. T. (2022). Phytochemical and antidiabetic analysis of *Curatella americana* L. aqueous extract on the rat pregnancy. *Journal of Ethnopharmacology*, 293, 115287.

Damasceno Débora Cristina., 2008. Anomalias congênitas: estudos experimentais. COOPMED.

David, N.D., Mauro, M.D.O., Gonçalves, C.A., Pesarini, J.R., Strapasson, R.L.B., Kassuya, C.A.L., Stefanello, M.É.A., Cunha-Laura, A.L., Monreal, A.C.D., Oliveira, R.J., 2014. *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: Bioprospecting of an anti-

inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. *J. Ethnopharmacol.* 154, 370–379. doi:10.1016/j.jep.2014.04.005

Dyer, L. A., Palmer, A. N. (2004). *Piper: Um Gênero Modelo para Estudos de Fitoquímica, Ecologia e Evolução*. Nova York, NY, EUA: Kluwer Academic/Plenum.

Flores, N., Jiménez, I. A., Giménez, A., et al. (2008). Derivados de ácido benzóico de espécies de Piper e sua atividade antiparasitária. *Jornal de Produtos Naturais*; 71 (9):1538–1543.

Gonçalves, C., Silva, N., Mauro, M., David, N., Cunha-Laura, A., Auharek, S., Monreal, A., Vieira, M., Silva, D., Santos, F., Siqueira, J., Oliveira, R., 2014. Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. *Genet. Mol. Res.*13, 4392–4405. doi:10.4238/2014.june.11.3

Gonçalves, C.A., Siqueira, J.M., Carollo, C.A., Mauro, M.D.O., Davi, N.D., Cunha-Laura, A.L., Monreal, A.C.D., Castro, A.H., Fernandes, L., Chagas, R.R., Auharek, S.A., Oliveira, R.J., 2013. Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: Teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. *J. Ethnopharmacol.* 150, 843–850. doi:10.1016/j.jep.2013.09.012

Ishikawa, R.B., Vani, J.M., Neves, S.C.D., Rabacow, A.P.M., Kassuya, C.A.L., Croda, J., Cardoso, C.A.L., Monreal, A.C.D.F., Antonioli, A.C.M.B., Laura, A.L.C., Oliveira, R.J., 2018. 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* 217, 1–6. doi:10.1016/j.jep.2018.01.034

Kato, M. J., Furlan, M. (2007). Química e evolução das piperáceas. *Química Pura e Aplicada*; 79 (4): 529-538.

Leitao, M. M., Radai, J. A., Ferrari, I. C., Negrão, F. J., Silva-Filho, S. E., Oliveira, R. J., ... & Kassuya, C. A. (2020). Effects of an ethanolic extract and fractions from *Piper glabratum* (Piperaceae) leaves on pain and inflammation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 117, 104762.

Manson, J.M., Kang, Y.J., 1994. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology, in: Manson, J.M., Kang, Y.J. (Eds), *Principles and methods of toxicology*. Raven Press, New York, pp. 989-1035.

Manson, J.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., Mcconnell, I., Hope, J., 1994. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* 8, 121–127. doi:10.1007/bf02780662

OECD - Test No. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, 2015. doi:10.1787/9789264242692-en

OECD - Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, 2002. .

OECD. Test No. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure. OECD publishing, 2008.

Oliveira, R.J., Oliva, S.U., Daroz, G.A., Rubio, E.M., 2005. Fertility assessment and possible external structural defects on progeny from male rats chronically exposed to arsenic. *Rev. bras. toxicol.* 18, 57.

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., 2009. Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 53, 164–173. doi:10.1016/j.yrtph.2008.12.007

Oliveira, R., Mantovani, M., Pesarini, J., Mauro, M., Silva, A.D., Souza, T., Ribeiro, L., 2015. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. *Genet. Mol. Res.* 14, 834–849. doi:10.4238/2015.february.2.8

Pessatto, L.R., Auharek, S.A., Gonçalves, C.A., David, N.D., Monreal, A.C.D., Kassuya, C.A.L., Antonioli-Silva, A.C.M.B., Stefanello, M.É.A., Oliveira, R.J., 2017. Effects of dichloromethane and butanol fractions of *Gochnatia polymorpha* subsp. *floccosa* in maternal reproductive outcome, embryo-fetal development and DNA integrity in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 200, 205–208. doi:10.1016/j.jep.2017.02.042

Prando, T. B. L., Baciquete, T. D. F., Vieira, J. A. C., Bressan, J., Gasparotto, F. M., Jesus, D. R., ... & Gasparotto Junior, A. (2014). Amides from Piper as a diuretic: Behind the ethnopharmacological uses of Piper glabratum Kunth. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.

Sene, L. D. B., Damasceno, D. C., Rocha, R., Iessi, I. L., Peraçoli, J. C., & Volpato, G. T. (2021). Influence of swimming program on the blood pressure of pregnant hypertensive rats and their fetuses. *Reproductive sciences*, 28(12), 3440-3447.

Soulimane-Mokhtari, N.A., Guermouche, B., Yessoufou, A., Saker, M., Moutairou, K., Hichami, A., Merzouk, H., Khan, N.A., 2005. Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. *Clin. Sci.* 109, 287–295. doi:10.1042/cs20050028

Staples, R.E., Schenell, V.L., 1964. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red method for fetal bone. *Stain Technol.* 39, 61-63.

Taylor, P., 1986. *Practical teratology*. London: Academic Press, pp.170

Vani, J.M., Monreal, M.T.F.D., Auharek, S.A., Cunha-Laura, A.L., Arruda, E.J.D., Lima, A.R., Silva, C.M.D., Antonioli-Silva, A.C.M.B., Lima, D.P.D., Beatriz, A., Oliveira, R.J., 2018. The mixture of cashew nut shell liquid and castor oil results in an efficient larvicide against *Aedes aegypti* that does not alter embryo-fetal development, reproductive performance or DNA integrity. *Plos One* 13. doi:10.1371/journal.pone.0193509 (b)

Vani, J.M., Schweich, L.D.C., Oliveira, K.R.W.D., Auharek, S.A., Cunha-Laura, A.L., Antonioli-Silva, A.C.M.B., Nazario, C.E.D., Oliveira, R.J., 2018. Evaluation of the

effects of the larvicides temephos on reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity of Swiss mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 148, 22–27. doi:10.1016/j.pestbp.2018.03.010 (a)

Wilson, M.E.; Ford, S.P., 2001. Comparative aspects of placental efficiency. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 58, 223-232.

Wilson, J.G., 1965. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. *Teratol.* 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., Petreere, J.A., Solomon, H.M., Yasuda, M., York, R.G., 1997. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1). *Teratol.* 55, 249–292. doi:10.1002/(sici)1096-9926(199704)55:4<249::aid-tera5>3.0.co;2-w

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados considera-se que o Extrato Etanólico de *Piper glabratum*:

- Tem baixo potencial materno tóxico que foi observado pela ausência de variações nos parâmetros biométricos e peso relativo dos órgãos além de ausência de sinais clínicos de toxicidade;
- Não altera o desempenho reprodutivo visto que não alterou o número de implantes, número de fetos vivos e mortos, viabilidade fetal, número de absorções, taxa de reabsorções e taxa de perdas pós-implantacional;
- Altera o desenvolvimento embrionário já que:
 - Reduziu o peso fetal para as doses de 1.000 e 2.000mg/Kg;
 - Reduziu o peso placentário para a dose de 1.000mg/Kg;
 - Reduziu e aumentou o índice placentários para as doses de 1.000 e 2.000mg/Kg, respectivamente;
 - Aumentou a eficiência placentária para a dose de 1.000mg/Kg;
 - Aumentou a frequência de fetos pequenos para a idade gestacional para as doses de 1.000 e 2.000 mg/Kg;
 - Aumentou a frequência global de fetos com malformações viscerais para a dose de 100mg/Kg;
 - Aumentou a frequência global de fetos com malformações esqueléticas para todos os grupos tratados com o extrato.

Frente ao exposto considera-se que o Extrato Etanólico de *Piper glabratum* tem potencial teratogênico, com importante interferência no processo de ossificação, e portanto desaconselha o seu uso durante a gestação.

7 REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, G. M. F. **Plantas Medicinais**. Bananeiras: Editora Universitária/UFPB, 2011. 23p.
- ADAMS, J. Prenatal exposure to teratogenic agents and neurodevelopmental outcome. **Birth defects original article series**, v. 25, n. 6, p. 63-72, 1989.
- ALVES, E. O.; MOTA, J. H.; SOARES, T. S.; VIEIRA, M. D. C.; SILVA, C. B. D. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 651-658, 2008.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 2013
- BASSO, E.; LOCATELLI, A. PLANTAS MEDICINAIS NO ENSINO DE CIÊNCIAS À LUZ DE UM “ESTADO DA ARTE”. **REPPE-Revista de Produtos Educacionais e Pesquisas em Ensino**, v. 4, n. 2, p. 183-209, 2020.
- BEZERRA, D.P.; MILITÃO, G.C.; CASTRO, F.O.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2007.
- BRANQUINHO, L. S.; SANTOS, J. A.; CARDOSO, C. A. L.; MOTA, J. D. S.; JUNIOR, U. L.; KASSUYA, C. A. L.; ARENA, A. C. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from Piper glabratum leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 372–378, 2017.
- Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000. Aprova o Regulamento técnico visando normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao sistema de vigilância sanitária. Diário Oficial da União 25 Fev 2000; Seção 1: 25.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos,**
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2020** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde, p. 217, 2020.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. RENISUS–Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais. 2009 (b).
- BRATMAN S. Guia prático de medicina alternativa: Uma avaliação realista dos métodos alternativos de cura. Rio de Janeiro(RJ):Campus; 1998.
- BRIGGS, G. G.; FREEMAN, R. K.; YAFFE, S. J. **Drugs in pregnancy and lactation: a reference guide to fetal and neonatal risk**. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

BRITO, J. C. M.; LIMA, W. G.; CARDOSO, B. G.; SIMIÃO, D. C.; AMORIM, J. M.; SILVA, C. A. Uso irracional de medicamentos e plantas medicinais contra a COVID-19 (SARS-CoV-2): Um problema emergente. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 2, n. 3, p. 37-53, 2020.

CAMPESATO, V. R. Uso de plantas medicinais durante a gravidez e risco para malformações congênitas. 2005.

CONNOR, J. M.; FERGUSON-SMITH, M. A. *Essential Medical Genetics*, Second ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1987

CORDERO, J. F.; OAKLEY, J. R.; GODFREY, P. Exposição a drogas durante a gravidez: algumas considerações epidemiológicas. **Clínica Obstetrícia e Ginecologia**, v. 26, n. 2, p. 418-428, 1983.

COUTINHO, D. F.; TRAVASSOS, L. M. A.; DO AMARAL, F. M. M. Estudo Etnobotânico de Plantas Medicinais Utilizadas em Comunidades Indígenas no Estado do Maranhão - Brasil. **Visão Acadêmica**, v. 3, n.1, p. 7-12, 2002.

CUNHA, P. C.; SILVA, A, P.; ROQUE, O. R. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Lisboa (POR): Fundação Calouste Gulbenkian; 2003.

ARAÚJO, I. S. A Medicina Popular: Mitos e Tabus. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 31, n. 3, p. 257-260, 1981.

DE CARLI, E. M.; HENCHEN, S. E.; CASTRO, B. A.; HONSE, T. RISCOS DO MAU USO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E PLANTAS MEDICINAIS. **Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão**, p. e22771-e22771, 2019.

Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 136 p.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber**. São Paulo: UNESP, 2007, 133p.

DICKE, J. M. Teratology: principles and practice. **Medical Clinics of North America**, v. 73, n. 3, p. 567-582, 1989.

DYER, L. A.; PALMER, A. N. *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution*, Kluwer Academic/Plenum, New York, NY, USA, 2004.

EISENBERG, D.; DAVIS, R. B.; ETTNER, S. L. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA*, v. 280, p. 1569-75, 1998.

FERGUSON, L. R.; FORD, J. H. Sobreposição entre mutagênicos e teratogênicos. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 396, n. 1-2, p. 1-8, 1997.

FLORES, N.; JIMÉNEZ, I. A.; GIMÉNEZ, A.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, I. L. Benzoic acid derivatives from Piper species and their antiparasitic activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1538-43, 2008.

França, I. S. X. D.; Souza, J. A. D.; Baptista, R. S.; Britto, V. R. D. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 61, p. 201-208, 2008.

- GALUCIO, N. C. R.; CORREA, R. M. S.; MOYSÉS, D. A.; PAIXÃO, P. M. F.; PINA, J. R. S.; QUEMEL, G. K. C.; VALE, V. V. Análise do perfil de segurança de medicamentos fitoterápicos no Brasil: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n.13, p. e159101320888-e159101320888, 2021.
- GUIMARÃES, E. F.; VALENTE, M. C.; REIS, A. Flora Ilustrada Catarinense: Piperaceae-Piper (Piperaceae). Herbário "Barbosa Rodrigues", 2001.
- HOLLIDAY, R. The possibility of epigenetic transmission of defects induced by teratogens. **Mutation research**, v. 422, n. 2, p. 203-205, 1998.
- JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus Piper (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 706–716, 2001
- JUCHAU, M. R. Bioactivation in chemical teratogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 165-187, 1989.
- JUNQUEIRA, A. P. F.; PERAZZOII, F. F.; SOUZA, F. H. B.; MAISTRO, E. L. Clastogenicity of Piper cubeba (Piperaceae) seed extract in an in vivo mammalian cell system. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 656-663, 2007.
- KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 529-538, 2007.
- LAMMER, E. J.; CORDERO, J. F.; Opitz, J. M.; Reynolds, J. F. Teratogenicity of anticonvulsant drugs. **American Journal of Medical Genetics**, v. 22, n. 3, p. 641-643, 1985.
- LEITAO, M. M.; RADAI, J. A.; FERRARI, I. C.; NEGRÃO, F. J.; SILVA-FILHO, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MOTA, J. S.; KASSUYA, C. A. Effects of an ethanolic extract and fractions from Piper glabratum (Piperaceae) leaves on pain and inflammation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 117, p. 104762, 2020.
- LEWIN, B., 2001. Genes VII. Porto Alegre: Artmed, 955p.
- MCELHATTON, P. R. Principles of teratogenicity. **Current Obstetrics & Gynaecology**, v. 9, n. 3, p. 163-169, 1999.
- MELO, J. R. R.; DUARTE, E. C.; MORAES, M. V. D.; FLECK, K.; ARRAIS, P. S. D. Automedicação e uso indiscriminado de medicamentos durante a pandemia da COVID-19. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, 2021.
- MOORE, B.A.; PERSUAD, T.V.N. Embriologia Básica. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- MORGAN, R. Enciclopédia das ervas e plantas medicinais: Doenças, Aplicações, Descrições e Propriedades. São Paulo(SP): Hermus; 1982.
- OECD - Test No. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, 2015.
- OLIVEIRA, R. J.; KANNO, T. Y. N.; SALLES, M. J. S.; LOURENÃ, O. A. C. S.; RIBEIRO, L. R.; FREIRIA, G. A.; MATIAZI, H. J. O; MANTOVANI, M.S.; SILVA, A. F. Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 53, n. 3, p. 164-73, 2009.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. M.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; Boll, P. M. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

Persaud, T. V. N. Environmental Causes of Human Birth Defects. Charles C Thomas, Springfield, 1990.

PRANDO, T. B.; BACIQUETE, T. F.; VIEIRA, J. A. C.; BRESSAN, J.; GASPAROTTO, F. M.; JESUS, D. R.; JUNIOR, E. L. C.; LOURENÇO, E. L. B.; JUNIOR, A. G. AMIDES from Piper as a Diuretic: Behind the Ethnopharmacological Uses of Piper glabratum Kunth. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 615109, 2014.

ROGERS, J. F.; THOMPSON, S. J.; ADDY, C. L.; McKEOWN, R. E.; COWEN, D. J.; DECOUFLE, P. Association of very low birth weight with exposures to environmental sulfur dioxide and total suspended particulates. **American journal of epidemiology**, v. 151, n. 6, p. 602-613, 2000.

RUTLEDGE, J. C. Toxicidade ao desenvolvimento induzida durante os estágios iniciais da embriogênese de mamíferos. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 396, n. 1-2, p. 113-127, 1997.

SCHARDEIN, J. L. Princípios de teratogênese aplicáveis a drogas e exposição química. **Defeitos de nascença quimicamente induzidos**, p. 1-45, 2000.

SHENKEL, E. P. Cuidados com medicamentos. Florianópolis(SC): UFSC; 1996.

SIMON D. O guia Decepar Chora de ervas: 40 receitas naturais para uma saúde perfeita. Rio de Janeiro (RJ): Campus; 2001.

TASLEEM, F.; AZHAR, I.; ALI, S. N.; PERVEEN, S.; MAHMOOD, Z. A. Analgesic and antiinflammatory activities of Piper nigrum L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2014

THOMPSON, M. W.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. Thompson & Thompson genetics in medicine, fifth ed. WB Saunders, Philadelphia, 1991

VALE, N. B. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? Rev Bras Anesthesiol, v. 52, n. 3, p. 368-80, 2002

WELLS, P. G.; KIM, P. M.; LAPOSA, R. R.; NICOL, C. J.; PARMANA, T.; WINN, L, M. Dano oxidativo na teratogênese química. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 396, n. 1-2, p. 65-78, 1997.

WELSCH, F. Abordagens in vitro para a elucidação de mecanismos de teratogênese química. **Teratologia**, v. 46, n. 1, p. 3-14, 1992.

XAVIER, M. S.; CASTRO, H. N.; de SOUZA, L. G. D.; de OLIVEIRA, Y. S. L.; TAFURI, N. F.; AMÂNCIO, N. D. F. G. Automedicação e o risco à saúde: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, p. 225-240, 2021.

ANEXO A – Comitê de ética



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



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos tóxico-reprodutivos, teratogênicos e (anti)genotóxicos dos extratos etanólicos de plantas com possíveis efeitos medicinais em camundongos Swiss", registrada com o nº 965/2018, sob a responsabilidade de **Rodrigo Juliano Oliveira** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 6ª reunião ordinária do dia 07/08/2018.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1º/10/2018 a 30/03/2020
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Nº de animais	Machos 620 / Fêmeas 520 = 1.140
Peso/Idade	30g / 8 - 10 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério - UT/INBIO/UFMS

Joize Stein
Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 08 de agosto de 2018.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.propp@ufms.br
fone (67) 3345-7925

ANEXO B – Artigo