

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
BRUCE SOARES CARDOSO

**Avaliação da toxicidade reprodutiva do extrato seco obtido das
folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum
(Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metilisoeugenol, em ratas Wistar**

Anápolis - GO

2016

BRUCE SOARES CARDOSO

**Avaliação da toxicidade reprodutiva do extrato seco obtido das
folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum
(Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliseugenol, em ratas Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Pesquisa, caracterização e desenvolvimento de produtos naturais ou sintéticos para saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Cristiane Santana Amaral.

Anápolis - GO

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Cardoso, Bruce Soares.

Avaliação da toxicidade reprodutiva do extrato seco obtido das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliseugenol, em ratas Wistar/ Bruce Soares Cardoso. - 2016.
100 f. il.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Cristiane Santana Amaral.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2016.
Bibliografia.

1. Toxicidade materna 2. Toxicidade do desenvolvimento 3. Desempenho reprodutivo 4. Parâmetros bioquímicos 5. Variações esqueléticas I. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRUCE SOARES CARDOSO

**“AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO SECO
OBTIDO DAS FOLHAS DE *PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS* (GOMES)
LANDRUM (MYRTACEAE), QUIMIOTIPO (*E*) - METILISOEUGENOL, EM
RATAS Wistar”**

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* – Mestrado em
Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás,
para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 29 de fevereiro de 2016, pela Banca
Examinadora constituída pelos seguintes professores:



Profa. Dra. Vanessa Cristiane Santana Amaral

Presidente da Banca

UEG/CET



Profa. Dra. Renata Mazaro e Costa

Membro Externo

UFG



Profa. Dra. Cátia Lira do Amaral

Membro Interno

UEG

À professora Vanessa C. S. Amaral, não apenas pela oportunidade, atenção e absoluto comprometimento com a realização desse trabalho, mas, principalmente, pelo exemplo profissional pautado pela ética, pela dedicação e pelo amor à construção e ao compartilhamento do conhecimento.

À minha família, pela obstinada e incansável dedicação em me conceder a oportunidade transformadora de estudar e, em especial, ao meu esposo Danilo Garcia, pelo amor que me ajuda a superar todos os meus desafios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, seja partilhando de seus conhecimentos, de sua infraestrutura ou de seu tempo, seja dando suporte material e técnico necessários a sua realização plena. Em especial, agradeço à professora Joelma A. M. de Paula pela dedicada orientação em todo o processo de produção e análise do extrato seco, ao professor Wilson M. Cruvinel pela parceria no fornecimento dos animais e na realização das análises bioquímicas, às alunas de iniciação científica Kátia B. Machado e Laís R. M. Silva pela ajuda na realização dos experimentos e, por fim, à FAPEG e PROBIP-UEG pelo suporte financeiro.

RESUMO

As folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Pp), uma espécie pertencente à família Myrtaceae, têm sido tradicionalmente usadas na medicina popular brasileira para o preparo de chás calmantes, digestivos e reguladores da função menstrual. Nas últimas décadas, vários estudos estabeleceram a caracterização botânica, o perfil fitoquímico e o potencial farmacológico de Pp que inclui propriedades antimicrobianas, ansiolítica, antidepressiva, antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória. Todavia, não há informação científica disponível sobre a toxicidade de Pp, especialmente durante a gestação. Assim, esse estudo investigou a toxicidade reprodutiva do extrato seco obtido das folhas de Pp, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m), durante a organogênese de ratas Wistar. Ademais, foi realizada a identificação do quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e foi calculado o rendimento do método de obtenção do extrato seco por nebulização (*spray drying*). Para tanto, as folhas de Pp foram coletadas, secas em estufa e depois trituradas. O pó obtido foi percolado em etanol 95% e o extrato etanólico bruto foi concentrado a vácuo e, na sequência, seco por nebulização. Para a avaliação da toxicidade reprodutiva, 42 fêmeas prenhes foram distribuídas em quatro grupos que receberam EPP_m, por *gavage*, nas doses de 2.000, 2.500 e 3.000 mg/kg, do dia gestacional (DG) 6 ao 15 (período da organogênese). O grupo controle recebeu apenas veículo. Os sinais clínicos de toxicidade materna, o ganho de peso e os consumos de água e de ração foram registrados do DG 0 ao 21. No DG 21, as fêmeas foram submetidas à cirurgia cesariana, eutanasiadas e examinadas quanto aos parâmetros de desempenho reprodutivo. Além disso, tiveram o sangue cardíaco coletado para avaliação de parâmetros bioquímicos relacionados às funções hepática e renal. Os fetos, por sua vez, foram removidos dos cornos uterinos, examinados macroscopicamente e, em seguida, diafanizados e corados com vermelho de alizarina. Posteriormente, foram avaliados quanto a presença de variações ou malformações esqueléticas. Os resultados confirmaram a identificação do quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol pela presença dos marcadores ácido gálico, catequina, quercitrina e (*E*)-metiliso Eugenol no perfil cromatográfico do EPP_m. A técnica de secagem por nebulização do EPP_m preservou os constituintes do fitocomplexo e apresentou rendimento satisfatório de 12,49%. Na avaliação toxicológica, os resultados mostraram que, durante o período da organogênese, houve redução no ganho médio de massa corporal materna em todos os grupos tratados com EPP_m quando comparados ao controle ($p \leq 0,01$). As progenitoras tratadas com 2.000 mg/kg de EPP_m aumentaram o consumo de água quando comparadas às fêmeas dos grupos controle e 3.000 mg/kg ($p \leq 0,05$). O tratamento com EPP_m não alterou o consumo de ração, nem os parâmetros bioquímicos e de desempenho reprodutivo das progenitoras tratadas com EPP_m. Ademais, não foram observadas alterações na análise externa fetal. Na análise esquelética, foram observadas algumas variações significativas e não relacionadas ao tratamento com EPP_m como costelas rudimentares, esterno bipartido, ossificação incompleta do esterno, dos metacarpos, das falanges anteriores e dos metatarsos ($p \leq 0,0084$). Portanto, conclui-se que o tratamento com EPP_m, nas doses de 2.000, 2.500 e 3.000 mg/kg, apresentou baixa toxicidade materna (redução no ganho de peso materno durante a organogênese) e não interferiu no desenvolvimento externo e esquelético de ratos Wistar.

Palavras-chave: Toxicidade materna. Toxicidade do desenvolvimento. Desempenho reprodutivo. Parâmetros bioquímicos. Variações esqueléticas.

ABSTRACT

Leaves of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Pp), a Myrtaceae specie, has been traditionally used in Brazilian folk medicine to prepare calming, digestive and emmenagogue teas. In the last decades studies have established the botanical characterization, the phytochemistry profile and the pharmacological potential of Pp, that includes antibiotic, anxiolytic, antidepressant, antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory properties. Therefore, there was no scientific information about Pp toxicity, especially during pregnancy. Therefore, this study aimed at investigating the reproductive toxicity of the dry leaf extract of Pp, (*E*)-methyl isoeugenol chemotype (EPP_m), during the organogenesis period of Wistar female rats. In addition, the (*E*)-methyl isoeugenol chemotype identification was verified by the presence of its chemical markers in high performance liquid chromatography (HPLC) and the EPP_m production by spray drying had its yield calculated. For these purposes, leaves of Pp were collected, dried and powdered. The powder obtained was percolated in ethanol 95%. The ethanolic extract was vacuum concentrated and spray drying. At this point, forty-two dams were divided in four groups which received EPP_m by gavage at the doses of 2000, 2500 or 3000 mg/kg from gestational day (GD) 6 through 15 (organogenesis period). The control group only received the vehicle. Maternal clinical signs of toxicity, body weight gain, food and water consumption were recorded from GD 0 to 21. On GD 21, the dams were submitted to cesarean section, euthanized and examined for the reproductive parameters. Furthermore, blood samples were collected through cardiac puncture for analysis of biochemistry parameters related to hepatic and renal markers. The fetuses, in turn, were removed from the uterus, macroscopically examined, and submitted to diaphanization processes and alizarin red staining. Then, the offsprings were evaluated for skeletal variations and malformations. The results confirm the (*E*)-methyl isoeugenol chemotype identification by the presence of chemical markers gallic acid, catechin, quercitrin and (*E*)-methyl isoeugenol in the EPP_m chromatography profile. The spray drying technique preserved the phytocomplex components and showed a satisfactory yield of 12,49%. Concerning the toxicological evaluation, the results showed that, in the organogenesis period, there were a marked reduction in the mean maternal body weight gain in all treatment groups when compared with control ($p \leq 0,01$). The dams treated with 2000 mg/kg increased the water consumption when compared to the dams treated with 3000 mg/kg and the control group ($p \leq 0,05$). There were no significant differences in the food consumption, neither in biochemical and reproductive parameters of the dams treated with EPP_m. Moreover, no changes were found in the external evaluation of the offsprings. In regard of the skeletal analysis, it was observed in the offsprings the presence of significant and no treatment-related variations as rudimentary ribs, bipartite sternebra, incomplete ossification of sternebra, metacarpals, metatarsals and anterior phalanges ($p \leq 0,0084$). In conclusion, the EPP_m treatment, in the doses of 2000, 2500 or 3000 mg/kg, showed low maternal toxicity (decrease of the maternal body weight gains during the organogenesis) and no interference in the external or skeletal development of Wistar rats.

Keywords: Maternal toxicity. Developmental toxicology. Reproductive outcome. Biochemistry parameters. Skeletal variations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), São Gonçalo do Abaeté - MG.....	17
Figura 02 - <i>Pseudocaryophyllus sericeus</i> O. Berg.....	22
Figura 03 - Distribuição geográfica das três variedades regionais da espécie <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae) na América do Sul, conforme L. R. Landrum.....	24
Figura 04 - Estruturas químicas dos principais constituintes dos óleos essenciais de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae).....	26
Figura 05 - <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), variedade <i>pseudocaryophyllus</i> , conforme descrição de L.R. Landrum.....	27
Figura 06 - Secções paradérmicas e transversal da lâmina foliar de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae)	29
Figura 07 - Secções transversais e longitudinais da casca de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae).....	30
Figura 08 - Espécies vegetais usadas como especiarias e com características organolépticas semelhantes.....	31
Figura 09 - Aguardente Cataia aromatizada com folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae) e artesanalmente produzida por mulheres caiçaras da Ilha do Superagui – PR.....	32
Figura 10 - Levantamento bibliográfico dos estudos voltados para investigação da espécie <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae).....	48
Figura 11 - Fluxograma do processo de preparação do extrato seco de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m).....	51
Figura 12 - Perfil cromatográfico do extrato seco obtido das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m).....	60
Figura 13 - Cromatograma do padrão primário ácido gálico.....	60
Figura 14 - Cromatograma do padrão primário catequina.....	61
Figura 15 - Cromatograma do padrão primário quercitrina.....	61
Figura 16 - Cromatograma do padrão primário (<i>E</i>)-metiliso Eugenol.....	62
Figura 17 - Cromatograma do solvente metanol (branco).....	62

Figura 18 -	Cromatogramas sobrepostos dos padrões primários ácido gálico, catequina, quercitrina e (<i>E</i>)-metiliso Eugenol.....	63
Figura 19 -	Perfil cromatográfico do extrato seco obtido das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m), identificados os marcadores químicos ácido gálico, catequina, quercitrina e (<i>E</i>)-metiliso Eugenol.....	64
Figura 20 -	Ganho médio de massa corporal (g) durante os períodos gestacionais de fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) nas doses de 2.000 (n=11), 2.500 (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da	66
Figura 21 -	Ganho relativo de massa corporal durante a gestação de fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) nas doses de 2.000 (n=11), 2.500 (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da organogênese.....	66
Figura 22 -	Consumo médio de água (mL) durante os períodos gestacionais de fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) nas doses de 2.000 (n=11), 2.500 (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da organogênese.....	67
Figura 23 -	Consumo relativo de água (%) durante a gestação de fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) nas doses de 2.000 (n=11), 2.500 (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da organogênese.....	68
Figura 24 -	Consumo médio de ração (g) durante os períodos gestacionais de fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) nas doses de 2.000 (n=11), 2.500 (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da organogênese.....	69
Figura 25 -	Consumo relativo de ração (%) durante a gestação de fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) nas doses de 2.000 mg/kg (n=11), 2.500 mg/kg (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da organogênese.....	69
Figura 26 -	Presença de reabsorções no corno uterino esquerdo de fêmea pertencente ao grupo que recebeu o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) na dose de 2.500 mg/kg durante a organogênese..	71
Figura 27 -	Variação no tamanho de fetos provenientes de fêmea tratada com a dose de 2.000 mg/kg de extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) no período da organogênese.....	72

Figura 28 -	Brotos ou costelas rudimentares na primeira vértebra torácica de feto de rata Wistar tratada com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> , (Gomes) Landrum, quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol, na dose de 2.000 mg/kg no período da organogênese.....	75
Figura 29 -	Comparação do padrão de ossificação do esterno de fetos de ratas Wistar tratadas com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol, no período da organogênese.....	5
Figura 30 -	Malformação esquelética fetal na coluna cervical de seis fetos de fêmea tratada com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol na dose de 2.500 mg/kg e durante o período da organogênese.....	76
Figura 31 -	Variações esqueléticas fetais em metacarpos, metatarsos e falanges anteriores e posteriores de fetos de ratas Wistar tratadas com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol na dose de 2.000 mg/kg e durante o período da organogênese.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Listagem das 15 espécies que integram o gênero <i>Pimenta</i> (Myrtaceae).....	21
Tabela 2 -	Classificação taxonômica da espécie <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae).....	23
Tabela 3 -	Estudos fitoquímicos realizados com a espécie <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae)	33
Tabela 4	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos das folhas da espécie <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae).....	37
Tabela 5 -	Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos obtidos das folhas da espécie <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae).....	39
Tabela 6 -	Alterações nas proporções dos constituintes da fase móvel ao longo de um gradiente pré-definido.....	52
Tabela 7 -	Metodologias analíticas adotadas nas dosagens bioquímicas.....	57
Tabela 8 -	Tempos de retenção coincidentes entre os picos obtidos no cromatograma da amostra do extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) quando comparados aos cromatogramas dos padrões primários testados.....	59
Tabela 9 -	Parâmetros de desempenho reprodutivo de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) nas doses de 2.000, 2.500 ou 3.000 mg/kg durante a organogênese.....	70
Tabela 10 -	Parâmetros bioquímicos hepáticos e renais de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) nas doses de 2.000, 2.500 ou 3.000 mg/kg durante a organogênese.....	71
Tabela 11 -	Ocorrência de anormalidade na morfologia externa de fetos de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) nas doses de 2.000, 2.500 ou 3.000 mg/kg durante a organogênese.....	72
Tabela 12 -	Ocorrência de variações esqueléticas nos ossos cranianos das ninhadas de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EPP _m) nas doses de 2.000, 2.500 ou 3.000 mg/kg durante a organogênese.....	73

- Tabela 13** - Ocorrência de variações e malformações no esqueleto axial das ninhadas de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EP_m) nas doses de 2.000, 2.500 ou 3.000 mg/kg durante a organogênese..... 74
- Tabela 14** - Ocorrência de alterações no esqueleto apendicular das ninhadas de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EP_m) nas doses de 2.000, 2.500 e 3.000 mg/kg durante a organogênese..... 77

LISTA DE SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
PNPMF	Programa Nacional de Planta Mediciniais e Fitoterápicos
RENISUS	Relação Nacional de Plantas de Interesse do SUS
Pp	<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EP_{pm}	Extrato seco obtido a partir das folhas da espécie <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum, quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
OE	Óleos essenciais
EE_B	Extrato etanólico bruto
EE_F	Frações do extrato etanólico bruto
CG	Cromatografia gasosa
MS	Espectroscopia de massas
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometro de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CIM	Concentração inibitória mínima
UV-B	Radiação ultravioleta tipo B
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
MAO	Monoamina oxidase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
UnB	Universidade de Brasília
UFG	Universidade Federal de Goiás
UEG	Universidade Estadual de Goiás
PUC-GO	Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Concea	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Ceua	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEPB	Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas
DG	Dia gestacional
FV	Fetos vivos

FM	Fetos mortos
SI	Sítios de implantação
CL	Corpos lúteos
RP	Reabsorções precoces
RT	Reabsorções tardias
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
FA	Fosfatase alcalina
KOH	Hidróxido de potássio
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> /Análise de variância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Referencial teórico.....	19
1.1.1 Classificação taxonômica da espécie <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae).....	19
1.1.1.1 Família <i>Myrtaceae</i> Juss.....	19
1.1.1.2 Gênero <i>Pimenta</i> Lindl.....	20
1.1.1.3. Espécie <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum.....	21
1.1.1.3.1 Morfologia e anatomia vegetal.....	27
1.1.1.3.2 Etnofarmacologia.....	30
1.1.1.3.3 Estudos fitoquímicos.....	32
1.1.1.3.4 Estudos farmacológicos.....	36
1.1.1.3.4.1 Propriedades antimicrobiana.....	37
1.1.1.3.4.2 Propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante.....	41
1.1.1.3.4.3 Atividade sobre o sistema nervoso.....	42
1.1.1.3.4.4 Propriedades larvicida e larvicida.....	43
1.1.1.3.5 Estudos toxicológicos.....	44
2 OBJETIVOS	49
2.1 Objetivo geral.....	49
2.2 Objetivos específicos.....	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 Material botânico.....	50
3.2 Preparação do extrato seco.....	51
3.3 Perfil cromatográfico.....	52
3.4 Aspectos éticos.....	53
3.5 Animais.....	53
3.6 Acasalamento.....	53
3.7 Grupos experimentais e doses.....	54
3.8 Gestação.....	55
3.8.1 Ganho de massa corporal, consumo de água e consumo de ração.....	55
3.8.2 Cesariana.....	56
3.9 Análises bioquímicas de parâmetros hepáticos e renais.....	56
3.10 Análise fetal.....	57
3.11 Análise estatística.....	58
4 RESULTADOS	59
4.1 Perfil cromatográfico do extrato seco.....	59

4.2 Toxicidade materna.....	65
4.2.1 Sinais clínicos de toxicidade.....	65
4.2.2 Ganho de peso.....	65
4.2.3 Consumo de água.....	67
4.2.4 Consumo de ração.....	68
4.2.5 Desempenho reprodutivo.....	70
4.2.6 Avaliação bioquímica de parâmetros hepáticos e renais.....	71
4.3 Toxicidade do desenvolvimento.....	72
4.3.1 Análise fetal externa.....	72
4.3.2 Análise esquelética fetal.....	73
4.3.2.1 <i>Observações no esqueleto axial</i>	73
4.3.2.2 <i>Observações no esqueleto apendicular</i>	76
5 DISCUSSÃO	79
5.1 Preparo e análise do extrato seco.....	79
5.2 Toxicidade reprodutiva do extrato seco obtido das folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum, quimiotipo (<i>E</i>)-metiliso Eugenol (EP _{pm}).....	81
5.2.1 Toxicidade materna.....	81
5.2.2 Toxicidade do desenvolvimento.....	84
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
7 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	99
Anexo A - Parecer substanciado Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEUA-PUC/GO).....	99
Anexo B – Artigo científico submetido à revista <i>Reproductive Toxicology</i>	100

1 INTRODUÇÃO

A terapêutica baseada em plantas medicinais, uma das mais disseminadas práticas da medicina tradicional, tem mantido seu papel fundamental no atendimento às necessidades primárias de saúde pública nos países em desenvolvimento, como o Brasil, enquanto ressurgiu nos países desenvolvidos como parte de uma medicina alternativa ou complementar às práticas alopáticas vigentes (OMS, 2014).

Diante desse cenário, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou quatro volumes de monografias intituladas *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants* com o objetivo de compilar a informação científica disponível sobre a segurança, a eficácia e o controle de qualidade de algumas dentre as principais espécies de plantas utilizadas com finalidade terapêutica no mundo (OMS, 1999). Na sequência, foi publicado o documento *WHO Traditional Medicine Strategy: 2002-2005*, no qual a OMS destacou a importância da iniciativa governamental na regulamentação das mais diversas práticas da medicina tradicional, bem como no fomento à pesquisa básica voltada para garantir o uso racional e seguro dessas abordagens alternativas em saúde, especialmente da fitoterapia (OMS, 2002).

Em consonância com a valorização da medicina baseada em plantas proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e em atenção aos apelos desta entidade para que os países legissem sobre o tema, o governo brasileiro aprovou, em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006). Essa política previa a criação de um programa nacional com o objetivo de garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Criado em 2009, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) visa promover o uso sustentável da biodiversidade da flora brasileira, a valorização e a preservação do conhecimento tradicional e o estímulo à pesquisa científica voltada para a elaboração de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2009a).

Como parte das iniciativas relacionadas no PNPMF, foi criada e divulgada pelo Ministério da Saúde a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). A RENISUS elenca 71 espécies vegetais tradicionalmente usadas na medicina popular brasileira com potencial de se transformarem em produtos para saúde de interesse do SUS (BRASIL, 2009b). O objetivo de relacionar tais plantas medicinais foi incentivar e subsidiar a realização de pesquisas encabeçadas por entidades públicas e privadas, com a finalidade de viabilizar a transformação dessas espécies em medicamentos fitoterápicos eficazes, seguros e de qualidade, orientando, assim, os investimentos da cadeia produtiva

nacional. Tais fitoterápicos seriam, portanto, ofertados pela rede de assistência farmacêutica básica do SUS como um cuidado primário em saúde fortemente conectado às tradições culturais do povo brasileiro (BRASIL, 2009b).

Dessa forma, ao colocar a pesquisa básica voltada para a bioprospecção de seus recursos naturais como uma política pública do Estado, o governo brasileiro estimulou centros de pesquisa privados e públicos a desenvolverem tecnologia que lhes permitisse explorar a riqueza da biodiversidade brasileira, cuja flora contém 22% das espécies de plantas superiores conhecidas no mundo (BRASIL, 2002). Dentre elas está a *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae, uma planta típica do Brasil (Figura 1), que possui diversos usos medicinais atribuídos pela cultura popular e potenciais propriedades farmacológicas previamente descritas na literatura (D'ANGELIS, 2013).

Figura 1 – *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, São Gonçalo do Abaeté - MG.



Fonte: Próprio autor (2013).

Todavia, o caminho para transformar uma planta medicinal com potencial farmacológico em um medicamento fitoterápico eficaz e seguro para uso em seres humanos é longo e demanda significativos investimentos em pesquisa e desenvolvimento. Sendo assim, novas tecnologias precisarão ser criadas para superar as dificuldades inerentes ao desenvolvimento de fitoterápicos, como o desenvolvimento de métodos extrativos eficientes e a padronização/otimização dos extratos produzidos com alto rendimento e em escala industrial (ZAMPIÉR, 2012).

Além dos desafios tecnológicos, o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico deve, ainda, atender a uma série de exigências legais previstas na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26, de 13 de maio de 2014, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Dentre eles, destaca-se a necessidade da apresentação de estudos não clínicos e clínicos de segurança e eficácia do medicamento, que deverão ser realizados de acordo com o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica (ANVISA, 2013). Tal guia descreve orientações para a execução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos em geral, incluindo fitoterápicos. Nele, são exemplos de estudos não clínicos de segurança os de toxicidade de dose única, de dose repetida, de genotoxicidade, de tolerância local, de segurança farmacológica e toxicocinética, de carcinogenicidade e, por fim, os estudos de toxicidade reprodutiva, como o realizado no presente trabalho. Os estudos não clínicos de segurança que abordam a toxicidade de xenobióticos durante a reprodução de mamíferos podem ser realizados durante cada uma das fases do desenvolvimento da prole ou em abordagem de estudo único que contemple todo o período reprodutivo, da fertilidade ao desenvolvimento pós-natal, incluindo a função materna (ANVISA, 2013).

Todavia, tais estudos não são capazes, por si só, de oferecer informação completa e definitiva sobre a toxicidade de quaisquer substâncias em humanos. Ainda assim, são um valioso recurso inicial na busca por informações acerca das manifestações pós-natais decorrentes da exposição pré-natal a xenobióticos-teste (OECD, 1995). Ademais, para que tais informações sejam confiáveis, é necessário que os protocolos experimentais adotados estejam de acordo com procedimentos devidamente validados, nos quais estão especificadas as orientações metodológicas para realização de experimentos em nível pré-clínico envolvendo mamíferos, comumente ratos. Ao final, a interpretação dos resultados alcançados poderá indicar a necessidade de estudos adicionais, além de contribuir com informações relevantes para a elaboração de futuros protocolos experimentais correlatos (OECD, 1995; ANVISA, 2013).

Nesse sentido, o estudo não clínico de segurança aqui apresentado propõe, especificamente, a primeira avaliação do potencial toxicológico do extrato seco obtido a partir das folhas da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m), quando administrado às ratas Wistar prenhes durante seu período de organogênese. Trata-se, portanto, não apenas de uma investigação do potencial teratogênico, como também das manifestações de toxicidade materna desencadeadas pela administração do EPP_m, seguindo protocolo experimental elaborado em consonância com as diretrizes do *OECD Guideline for Testing Chemicals* nº 421, de 27 de julho de 1995, intitulada *Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*.

Sendo assim, o estudo aqui proposto representa um primeiro passo na construção do conhecimento necessário para atestar a segurança do uso medicinal da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, ao mesmo tempo em que contribui para o processo de desenvolvimento tecnológico envolvido na preparação do EPP_m pela técnica de secagem por nebulização.

1.1 Referencial Teórico

1.1.1 Classificação taxonômica da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae)

1.1.1.1 Família Myrtaceae Juss.

A família Myrtaceae Juss é composta por cerca de 4.000 espécies abarcadas em 130 gêneros distribuídos pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta (PAULA et al., 2010). Apenas no Brasil existem cerca de 1.000 espécies de mirtáceas subdivididas em 23 gêneros, fazendo desta família botânica uma das mais importantes da flora brasileira, frequentemente representando o componente lenhoso dominante em áreas cobertas pela Mata Atlântica (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

De difícil classificação, o correto enquadramento das novas espécies de Myrtaceae é dificultado pelos limites ambíguos que distinguem alguns de seus gêneros. Adicionalmente, estima-se que metade das espécies de Myrtaceae brasileiras ainda não tenham sido sequer mencionadas nos livros dedicados ao tema, fato que, devido ao avanço do desmatamento, torna ainda mais premente a necessidade de que sejam estudadas e investigadas (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

No Brasil, dentre as espécies pertencentes à família Myrtaceae, destacam-se árvores frutíferas nativas e muito populares, como as jaboticabeiras (Gênero *Plinia*) e as goiabeiras (Gênero *Psidium*). Economicamente, os eucaliptos (Gênero *Eucalyptus*), nativos da Oceania, são hoje cultivados mundialmente e fornecem matéria prima para os produtores de papel, carvão vegetal e madeira. Há, ainda, o cravo-da-índia (Gênero *Syzygium*), uma das famosas especiarias, cuja importância comercial permanece forte nos dias de hoje (SOUZA; LORENZI, 2005). Por fim, ressalta-se o número elevado de espécies de Myrtaceae com uso medicinal enraizado na cultura popular brasileira e, portanto, com potenciais propriedades farmacológicas a serem investigadas, dentre as quais destaca-se, aqui, a *P. pseudocaryophyllus* (PAULA et al., 2010).

1.1.1.2 Gênero *Pimenta* Lindl.

O gênero *Pimenta* Lindl foi criado pelo botânico inglês John Lindley em 1821 para acomodar o primeiro espécime identificado até então, a *Pimenta dioica* (L.) Merrill, cujos frutos são usados como condimento picante semelhante à pimenta-do-reino. Atualmente, 15 espécies de *Pimenta* estão catalogadas (Tabela 1), todas elas com uma combinação de características peculiares em seus ovários e sementes que as diferenciam dos demais gêneros da família Myrtaceae (LANDRUM, 1986).

No geral, as pimentas são árvores de pequeno e médio porte, embora menos frequentemente possam ser encontradas como arbustos. Geograficamente, todas as espécies do gênero estão distribuídas pelas florestas tropicais do Caribe e da América Central, exceção feita à *P. pseudocaryophyllus*, única *Pimenta* nativa da América do Sul, mais especificamente do sudeste brasileiro (LANDRUM, 1986).

No Brasil, embora o termo pimenta escolhido por J. Lindley para batizar o novo gênero de Myrtaceae remeta aos frutos picantes de algumas espécies dos gêneros *Capsicum* (*Solanaceae*) e *Piper* (*Piperaceae*), os parentes mais próximos das pimentas de Lindley estão no gênero *Blepharocalyx* (*Myrtaceae*).

Ainda assim, a nomenclatura escolhida por Lindley justifica-se, uma vez que, no geral, as espécies do gênero *Pimenta* são plantas ricas em óleos essenciais que lhes conferem sabor picante e forte aroma característicos apreciados na culinária caribenha (LANDRUM, 1986).

Tabela 1 - Listagem das 15 espécies que integram o gênero *Pimenta* (Myrtaceae)

Gênero <i>Pimenta</i>
<i>Pimenta adenoclada</i> (Urban) Burret
<i>Pimenta cainitoides</i> (Urban) Burret
<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merrill
<i>Pimenta ferruginea</i> (Grisebach) Burret
<i>Pimenta guatemalensis</i> (Lundell) Lundell
<i>Pimenta felipes</i> (Urban) Burret
<i>Pimenta haitiensis</i> (Urban) Landrum
<i>Pimenta jamaicensis</i> (Britton & Harris) Proctor
<i>Pimenta obscura</i> Proctor
<i>Pimenta odiolensis</i> (Urban) Burret
<i>Pimenta oligantha</i> (Urban) Burret
<i>Pimenta podocarpoides</i> (Areces) Landrum
<i>Pimenta racemosa</i> (P. Miller) J. W. Moore
<i>Pimenta richardii</i> Proctor
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum

Fonte: LANDRUM, (1986)

1.1.1.3 Espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum

O primeiro registro de *P. pseudocaryophyllus* deu-se no Brasil colonial em 1812, nas proximidades da cidade do Rio de Janeiro e foi realizado pelo botânico português Bernardino Antônio Gomes, que a classificou como *Myrtus pseudocaryophyllus* (GOMES, 1812 apud LANDRUM, 1986). Em 1858, reconhecendo que a espécie descrita por Gomes não se enquadrava corretamente no gênero *Myrtus*, o botânico alemão Otto K. Berg propôs a criação do Gênero *Pseudocaryophyllus* para abrigar a exótica espécie brasileira (BERG, 1858). Apenas no final do século XX, no ano de 1986, a espécie *pseudocaryophyllus* (falso-cravo) seria reclassificada, agora no gênero *Pimenta* Lindl. pelo botânico estadunidense Leslie Roger

Landrum, classificação que permanece atual, como: *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (LANDRUM, 1986). Nas palavras de Landrum:

Penso que se a *Pimenta pseudocaryophyllus* crescesse na região do Caribe, não haveria dúvidas sobre tratar-se de uma verdadeira espécie de *Pimenta*. Suspeito que ela seja uma espécie primitiva do gênero que de alguma maneira isolou-se das demais na América do Sul (LANDRUM, 1986, p. 100, tradução nossa).

Seu isolamento na América do Sul, as características peculiares de seus ovários e sementes e o longo período de quase dois séculos transcorrido da descoberta da espécie *pseudocaryophyllus* por Gomes até seu enquadramento no gênero *Pimenta* por Landrum, certamente contribuíram para dificultar o enquadramento taxonômico da *Pimenta pseudocaryophyllus*, fazendo com que sua nomenclatura científica se tornasse quase tão diversa quanto a popular. São sinônimos científicos de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum os termos: *Myrtus pseudocaryophyllus* Gomes, *Pseudocaryophyllus sericeus* O. Berg (Figura 2) e também *Eugenia acuminata* Link, *Eugenia fulvescens* A.DC, *Eugenia leandreana* O. Berg, *Eugenia mutabilis* O. Berg, *Eugenia pseudocaryophyllus* (Gomes) DC., *Myrtus fulvescens* (DC.) Kiaersk., *Myrtus velutina* (O. Berg) Kiaersk., *Pseudocaryophyllus costatus* O. Berg, *Pseudocaryophyllus acuminatus* (Link) Burret, *Pseudocaryophyllus organensis* Burret, *Pseudocaryophyllus glaziovianus* (Kiaersk.) Burret, *Pseudocaryophyllus chrysophyllus* Burret, *Pseudocaryophyllus platyphyllus* Burret, *Pseudocaryophyllus jaccoudii* Matos, *Pseudocaryophyllus fulvescens* (A. DC) O. Berg, *Pseudocaryophyllus velutinus* O. Berg, *Pseudocaryophyllus mutabilis* (O. Berg) Burret, *Pseudocaryophyllus hoehnei* Burret, *Pseudocaryophyllus emarginatus* Burret e *Pseudocaryophyllus theifer* Toledo (D'ANGELIS; NEGRELLE, 2014).

Figura 2 - *Pseudocaryophyllus sericeus* O. Berg.



Fonte: BERG, (1858).

Apesar de complexa, Landrum (1986) conseguiu estabelecer a classificação taxonômica completa de *P. pseudocaryophyllus*, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação taxonômica da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae)

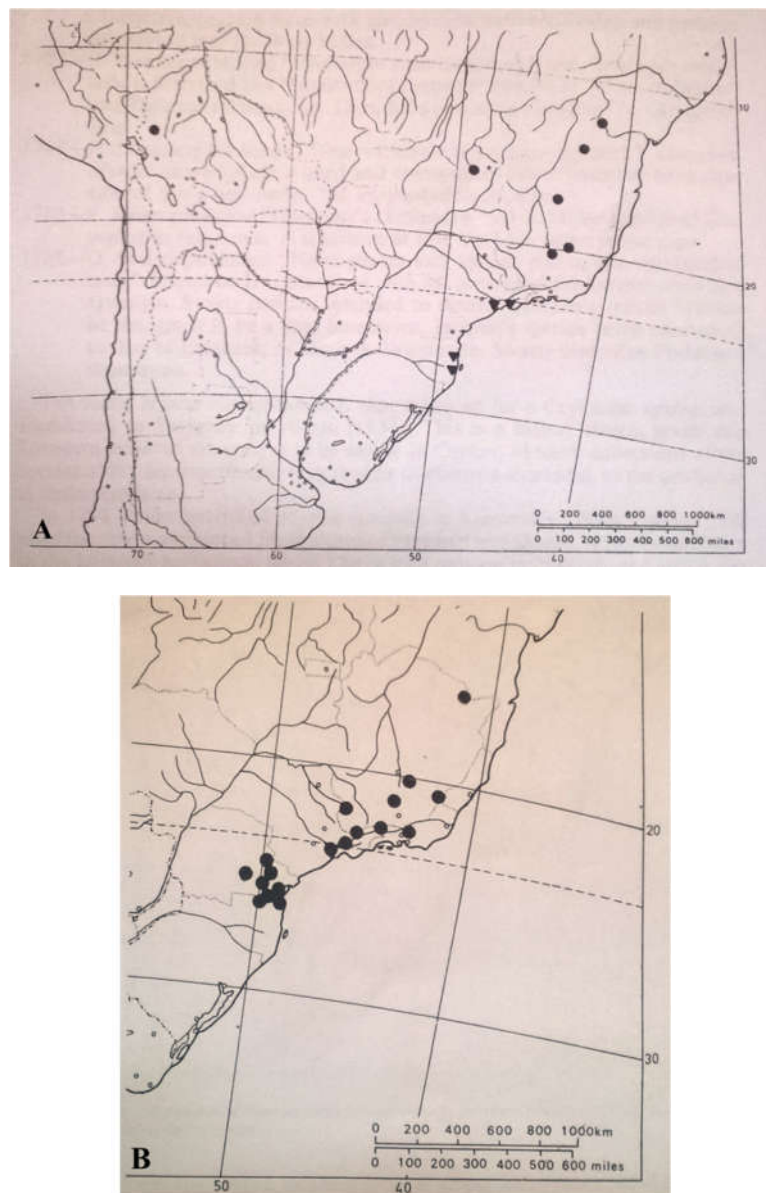
CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Magnolipsida
Ordem	Myrtales
Família	Myrtaceae Juss.
Subfamília	Myrtoidea
Tribo	Myrtaea
Subtribo	Myrtinae
Gênero	<i>Pimenta</i> Lindl.
Espécie	<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum

Além disso, Landrum (1986), depois de observar distinções, especialmente, nas folhas e nas inflorescências de alguns espécimes de *P. pseudocaryophyllus*, ainda categorizou a espécie em três variedades regionais geograficamente distribuídas pelo território sul-americano (Figuras 3A e 3B). São elas:

- *P. pseudocaryophyllus* var. *hoehnei* (Burret) Landrum: pequena árvore confinada às florestas da área costeira que se estende de Santa Catarina a São Paulo.
- *P. pseudocaryophyllus* var. *fulvescens* (DC.) Landrum: pequena árvore ou arbusto que cresce em áreas relativamente secas no interior da região centro-sul brasileira, chegando ao território boliviano.

- *P. pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus*: pequena árvore típica das áreas de florestas nas regiões montanhosas do sudeste brasileiro.

Figura 3 – Distribuição geográfica das três variedades regionais da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum na América do Sul, conforme L.R. Landrum.



Legenda: A - Variedade *fulvescens* (Círculos), variedade *hoehnei* (Triângulos); B - Variedade *pseudocaryophyllus*. Fonte: Landrum (1986).

Em 2011, Paula e colaboradores verificaram que além da diversidade regional atribuída por Landrum em 1986, a espécie *P. pseudocaryophyllus* apresenta, ainda, variabilidade infraespecífica geneticamente determinada ao longo de sua evolução. Essa variabilidade pode

ter resultado de alterações nas rotas metabólicas de *P. pseudocaryophyllus*, originando, assim, espécimes quimicamente polimorfos, os quimiotipos (PAULA et al., 2011). Nesse estudo, foram coletadas 12 amostras de árvores maduras nos municípios de Brasília – DF em janeiro de 2006, São Gonçalo do Abaeté – MG em fevereiro de 2006 e São José do Barreiro - MG em julho de 2007. Após a análise por cromatografia gasosa dos óleos essenciais extraídos das folhas dos 12 espécimes coletados, Paula et al. (2011) identificaram três quimiotipos:

- Quimiotipo citral: 36 constituintes voláteis identificados nas amostras de óleos essenciais analisadas, com predominância de monoterpenos (77,9%), dentre eles seus principais constituintes, os isômeros geranial/neral, conhecidos como citral.
- Quimiotipo (*E*)-cariofileno: 31 constituintes voláteis identificados nas amostras de óleos essenciais analisadas, com predominância de sesquiterpenos (55,1%), tendo como principais constituintes a (*E*)-asarona, o (*E*)-cariofileno e a elemicina.
- Quimiotipo (*E*)-metiliseugenol: 15 constituintes voláteis identificados nas amostras de óleos essenciais analisadas, com predominância absoluta de fenóis (96,8%), como o fenilpropanoide (*E*)-metiliseugenol.

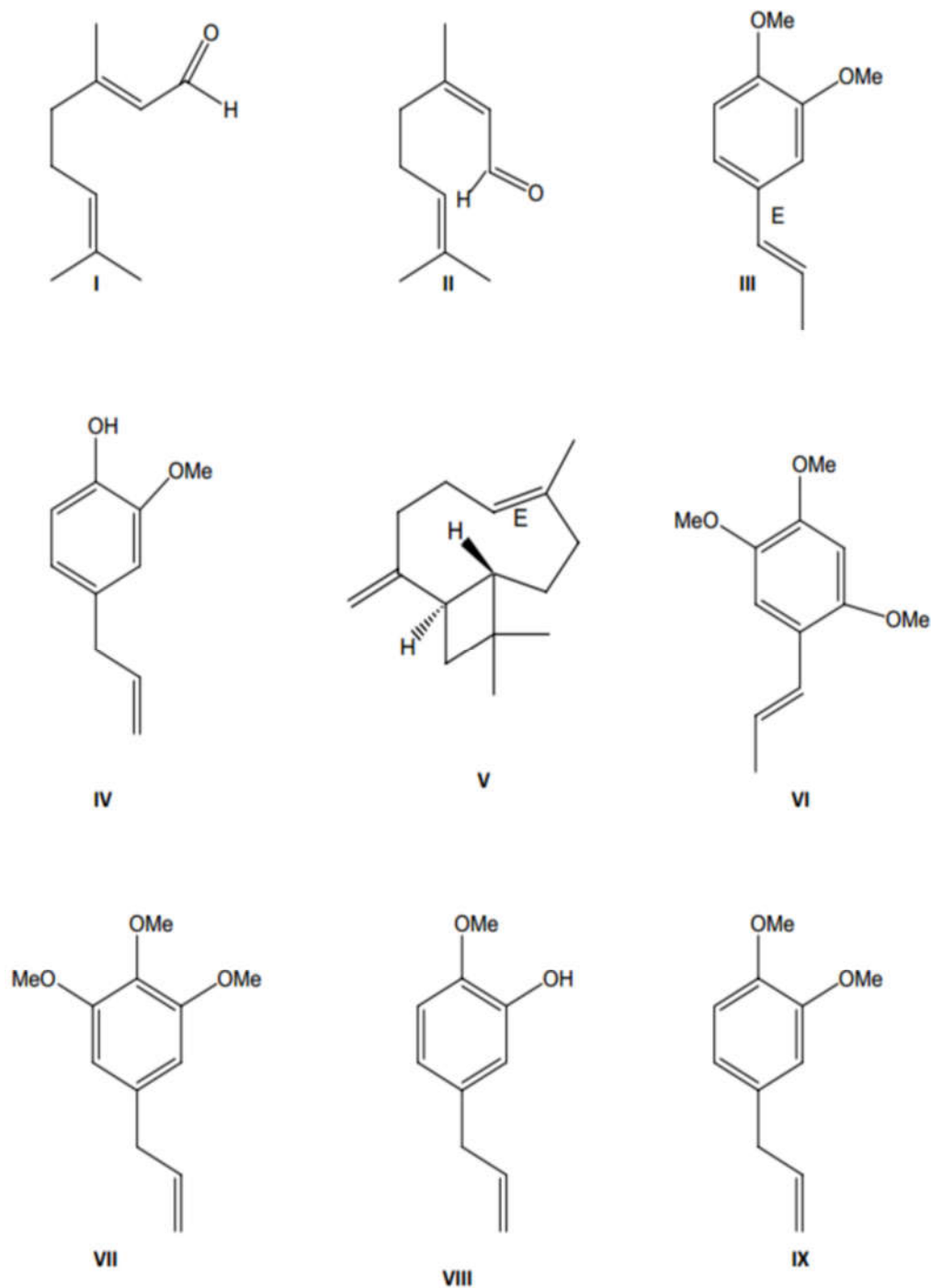
Estudos prévios descrevem esta diversidade da composição dos óleos essenciais extraídos de *P. pseudocaryophyllus* e destacam diferentes substâncias como constituintes predominantes nestes óleos (Figura 4), entre elas o geranial e o neral (NAKAOKA SAKITA et al., 1994), o eugenol (LIMA et al., 2006) e o chavibetol (SANTOS et al., 2009). Sendo assim, é muito provável que a variabilidade infraespecífica de *P. pseudocaryophyllus* seja ainda maior, demonstrando sua diversidade bioquímica e genética (PAULA et al., 2011).

Recentemente, foram desenvolvidos os primeiros marcadores genéticos de *P. pseudocaryophyllus*, 12 microssatélites obtidos do ácido desoxirribonucleico (DNA) de um espécime coletado no sudeste do Brasil. Esses marcadores microssatélites serão úteis em futuros estudos ecológicos sobre a estrutura populacional e a diversidade genética dessa Myrtaceae (MORGANTE et al., 2012) encontrada em áreas de elevada altitude cobertas pela Mata Atlântica e também no Cerrado (cerradão), estendendo-se do sul da Bahia ao Rio Grande do Sul e do litoral sudeste brasileiro ao território boliviano (LANDRUM, 1986; LORENZI, 2002).

Pouco exigente em relação às características do solo, a *P. pseudocaryophyllus* é uma planta nativa que pode ser encontrada em solos pobres, pouco profundos, comportando-se como

uma espécie esciófila, semidecídua, seletiva, xerófila e pioneira, que floresce de outubro a dezembro, podendo apresentar frutos maduros durante quase todo o ano (LORENZI, 1998; FARIAS et al., 2009; LANDRUM, 1986).

Figura 4 - Estruturas químicas dos principais constituintes dos óleos essenciais de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).

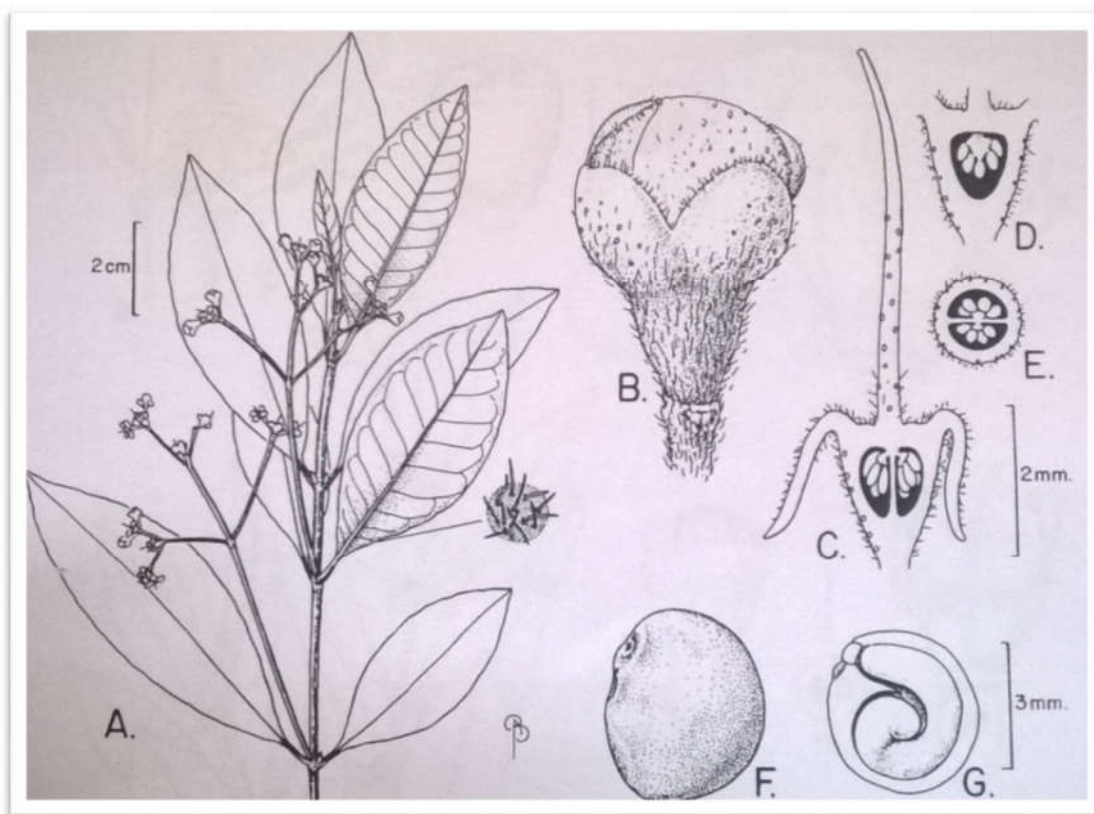


Legenda: I, geranial. II, neral. III, (E)-metilisoeugenol. IV, eugenol. V, (E)-cariofileno. VI, (E)-asarona. VII, elemicina. VIII, chavibetol. IX metileugenol. Fonte: Reproduzido de PAULA (2011) p. 87.

1.1.1.3.1 Morfologia e anatomia vegetal

De difícil classificação, a *P. pseudocaryophyllus* distingue-se das demais espécies do gênero *Pimenta* pela presença de flores tetrâmeras, ovários biloculares contendo de 3 a 6 óvulos por lóculo e cobertura muito dura da semente, além de ser a única Myrtaceae que combina embrião espiralizado e intumescido com a rígida cobertura da semente (LANDRUM, 1986), como mostra a Figura 5.

Figura 5 - *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), variedade *pseudocaryophyllus*, conforme descrição de L.R. Landrum.



Legenda: **A** - Ramo jovem com inflorescências em panículo e destaque para os pelos na superfície inferior da folha. **B** - Botão floral após a queda das brácteas. **C** - Corte longitudinal do ovário com 2 lóculos. **D** - Corte longitudinal do ovário mostrando um lóculo. **E** - Corte transversal do ovário. **F** - Semente, parte externa. **G** - Corte da semente mostrando a casca rígida, o opérculo e o embrião em espiral. Desenho de Bobbi Angell. Fonte: Landrum (1986).

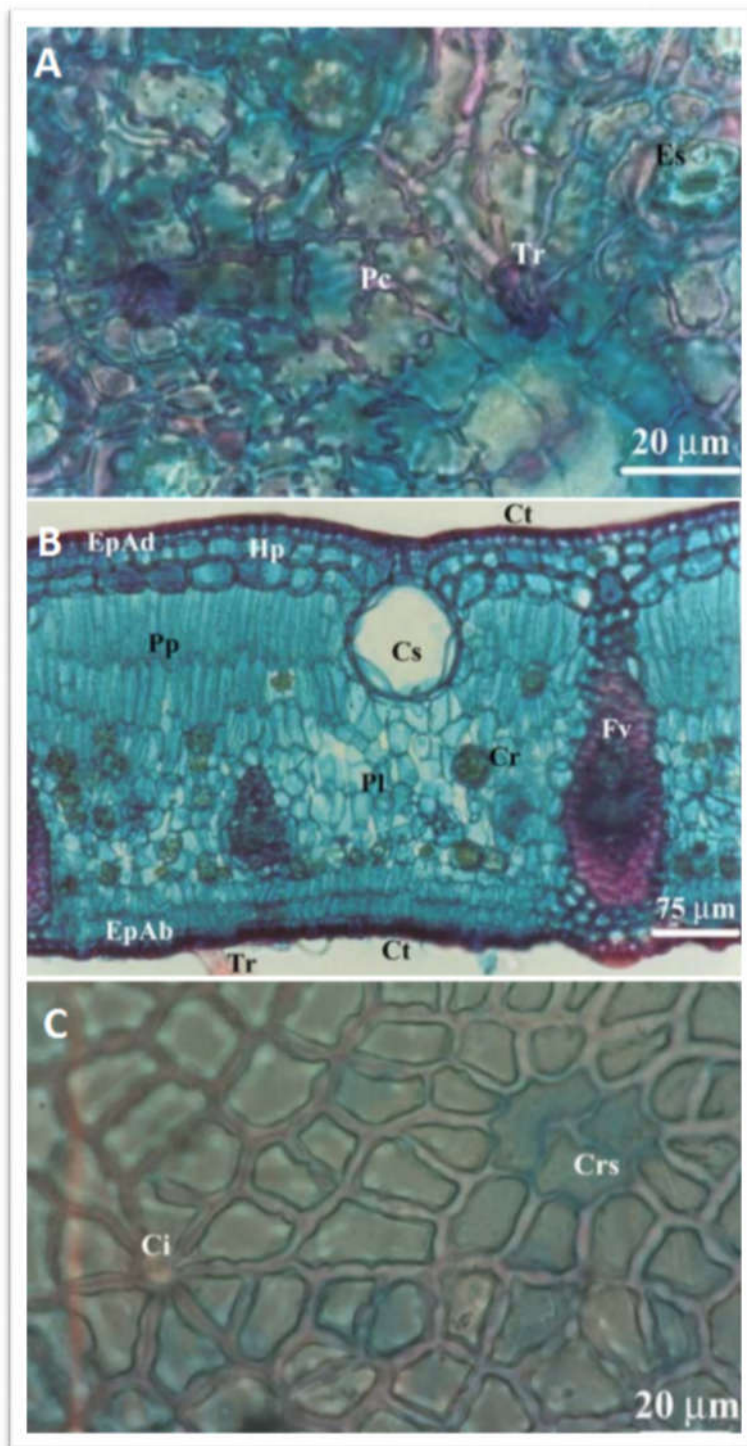
Pioneiro na investigação e classificação da espécie *P. pseudocaryophyllus*, o botânico Leslie R. Landrum assim a descreve:

Arbustos ou **árvores** com 1-10 m de altura, variando de densamente cobertas com pelos a completamente lisas quando jovens e com pequena superfície

foliar. **Pelos** prateados, marrom amarelados ou marrom avermelhados, simples, de até 1 mm de comprimento, retos ou enrolados, aglutinados ou espalhados. **Galhos jovens** lisos, aglutinados, pubescentes ou tomentosos, tendendo a lisos com a idade, com casca lisa, marrom-avermelhada, marrom-acinzentada ou marrom-amarelada, tornando-se depois cinza e áspera. **Folhas** elípticas, obovadas, ovais, elíptico-oblongas ou elíptico-oblanceoladas, 4 - 22 cm de comprimento, 1 - 7,3 cm de largura, de 1,5 a 4,3 vezes tão longas quanto largas, lisas a densamente pubescentes ou tomentosas na parte inferior, lisas a moderadamente puberulentas na parte superior, algumas vezes densamente cobertas por pelos ao longo da nervura central, com margens reviradas; *ápice* acuminado, agudo, obtuso, raramente arredondado ou emarginado; *base* acuminada, cuneada ou arredondada; *pecíolo* com 3-20 mm de comprimento, 1-2 mm de espessura, de liso a densamente coberto com pelos; *nervura central* impressa suavemente na região proximal, plana ou ligeiramente elevada na parte superior, proeminente na parte inferior; *nervuras laterais* com 8-22 pares distinguíveis, usualmente proeminentes na parte inferior, frequentemente um pouco elevadas na parte superior, as nervuras secundárias são quase tão proeminentes quanto as laterais; *nervuras marginais* mais ou menos iguais às nervuras laterais, arqueando de um lateral a outra ou quase paralelas às margens; lâminas severamente coriáceas, marrom avermelhado, verde amarelado ou verde acinzentado quando secas, lustrosas ou embaçadas na parte superior. **Inflorescências** de até 12 cm de comprimento, com (1-)3-15 flores, cobertas com pelos de forma esparsa a densa, com queda tardia, em dicásio (raramente reduzido a uma flor) ou em panículo [...]; *Ovário* com 2 lóculos. Óvulos 3 a 6 em uma placenta semelhante a um talo, emergindo do septo superior. **Frutos** subgloboso, 0,8 a 1,5 cm de comprimento. **Sementes** duras, reluzentes, às vezes angulares, de 0,5 a 0,8 cm de comprimento, embrião com cotilédones de tamanho muito pequeno, hipocótilo aumentado em até 3 vezes a largura dos cotilédones, em forma espiral, revestido por cobertura em forma de C. (LANDRUM, 1986, p. 99-100, tradução nossa)

Decorridos quase 30 anos desde a caracterização de *P. pseudocaryophyllus* estabelecida por Landrum, os estudos farmacognósticos voltados para a investigação desta espécie continuam escassos. Farias et al. (2009), em análise morfo-anatômica da lâmina foliar de *P. pseudocaryophyllus*, identificaram características frequentemente observadas em Myrtaceae, como a predominância de cavidades secretoras, complexos estomáticos anomocíticos ou paracíticos e presença de numerosos idioblastos portadores de drusas. Paula et al. (2008), por sua vez, identificaram padrões diferentes de nervação, do tamanho do pecíolo e da nervura principal ao comparar folhas de espécimes coletados em São Gonçalo de Abaeté, Minas Gérias, com espécimes coletados em Brasília, Distrito Federal (Figura 6). Esses achados sugerem que pode haver variabilidade morfo-anatômica intraespecífica entre exemplares de *P. pseudocaryophyllus* de diferentes biomas do Brasil. Adicionalmente, Paula et al. (2010) analisaram a casca de *P. pseudocaryophyllus* e observaram as estruturas do floema e do ritidoma, como mostra a Figura 7.

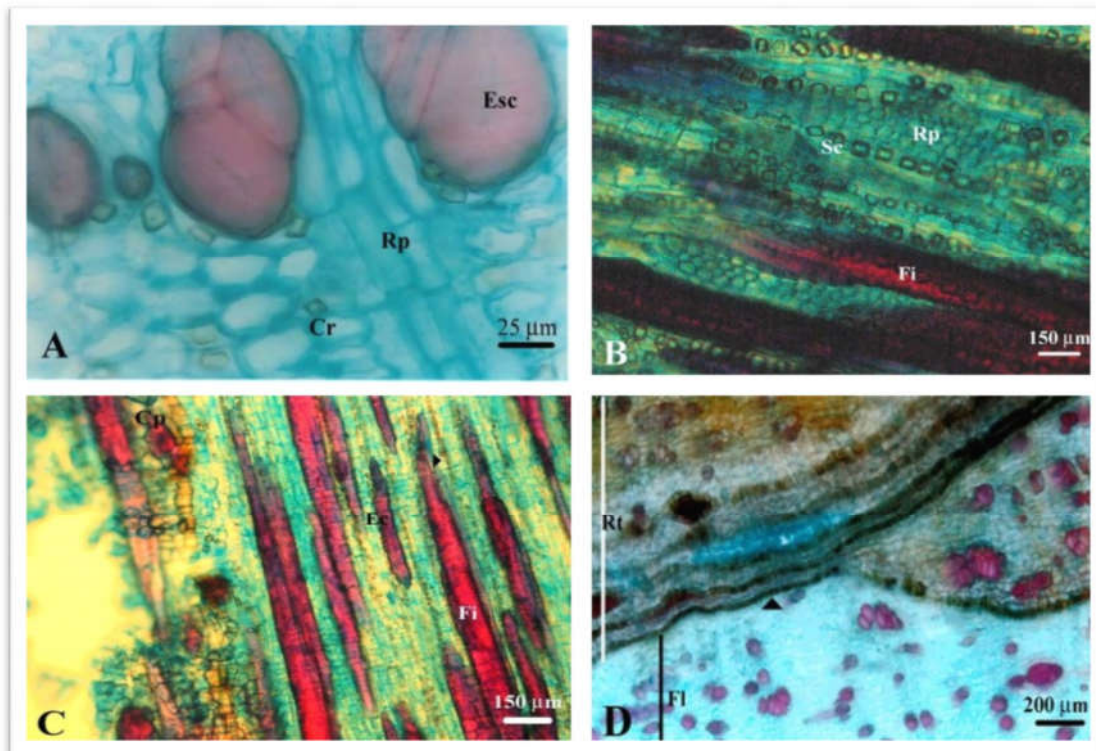
Figura 6 – Secções paradérmicas e transversal da lâmina foliar de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).



Legenda: A - Detalhe da epiderme abaxial da folha adulta. B - Lâmina foliar em corte transversal. C - Detalhe da epiderme adaxial da folha adulta.

Abreviaturas: Crs.: célula que reveste cavidade secretora; Ci.: cicatriz deixada após queda do tricoma tector; Pc.: parece celular; Es.: estômato; Cr.: Cristais – drusa; Cs., cavidade secretora; Ct.: cutícula; EpAd.: epiderme adaxial; EpAb.: epiderme abaxial; Fv.: feixe vascular; Hp.: hipoderme; Pl.: parênquima lacunoso; Pp.: parênquima paliádico; Tr.: tricoma tector. Fonte: Paula (2006).

Figura 7 – Secções transversais e longitudinais da casca de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).



Legenda: A - secção transversal demonstrando detalhes do floema. B - secção longitudinal tangencial da região do floema. C - secção longitudinal radial. D - Secção transversal demonstrando as regiões do floema e do ritidoma. **Abreviaturas:** Cp.: células pétreas; Cr: cristais prismáticos de oxalato de cálcio; Ec.: escleroide; Esc.: esclerênquima; Fi.: fibras/fibroesclereíde; Fl.: floema; Rp.: raios parenquimáticos; Rt.: ritidoma; Sc.: série cristalífera; setas indicam série cristalífera na Figura 1C e periderme na 1D. Fonte: Paula et al. (2010).

1.1.1.3.2 Etnofarmacologia

A *P. pseudocaryophyllus* é uma espécie vegetal amplamente utilizada na cultura popular brasileira. Especialmente em comunidades do centro-sul do país, é utilizada na culinária, na carpintaria, na produção de aguardente, no reflorestamento, na arborização e na preparação de chás medicinais (LEGRAND; KLEIN, 1978 apud LANDRUM, 1986; LORENZI, 1998; D'ANGELIS; NEGRELLE, 2014).

Popularmente, a *P. pseudocaryophyllus* é conhecida no Brasil como cravo, pau-cravo, craveiro, falso cravo, craveiro do mato, louro, louro-cravo, louro da terra, louro falso, chá de bugre, chá da terra, limão do mato e cataia. Essa espécie foi associada no imaginário popular ao cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry, Myrtaceae) e ao louro (*Laurus nobilis* L., Lauraceae), possivelmente pelas características organolépticas semelhantes das três espécies (Figura 8), que são usadas como condimento na culinária brasileira, tanto pelo

aroma característico que exalam quanto pelo sabor ardente de suas folhas e frutos (D'ANGELIS; NEGRELLE, 2014).

Figura 8 – Espécies vegetais usadas como especiarias e com características organolépticas semelhantes.



Legenda: A - *Syzygium aromaticum*. B - *Pimenta pseudocaryophyllus*. C - *Laurus nobilis*.
Fonte: TROPICOS, (2015).

Da sinonímia popular, especialmente dos termos chá de bugre e cataia, é possível ainda observar que o uso da espécie *P. pseudocaryophyllus* remete à ancestralidade indígena brasileira. O termo pejorativo “bugre”, do francês *bougre* = herético, era usado pelos colonizadores para se referir aos indígenas selvagens, não catequisados (HOUAISS, 2009). O termo cataia, por sua vez, é uma palavra com origem no idioma tupi-guarani, cujo significado é “folha que queima” (D'ANGELIS, 2013).

Tradicionalmente, a cataia, nome pelo qual a espécie *P. pseudocaryophyllus* é conhecida no litoral dos estados de São Paulo e Paraná, tem suas folhas utilizadas na aromatização de aguardente produzida por comunidades caiçaras. Na Barra do Ararapira, região da Ilha do Superagui, no estado do Paraná, uma associação de mulheres produz a aguardente de Cataia (Figura 9), uma importante fonte de renda graças à comercialização da bebida que é um símbolo da cultura caiçara local (D'ANGELIS, 2013).

As folhas de *P. pseudocaryophyllus* são também usadas tradicionalmente no preparo de bebidas refrescantes (LIMA et al., 2006), de inalações, de soluções alcoólicas para massagens (MORGANTE et al., 2012) e, principalmente, de chás com ações terapêuticas diurética, afrodisíaca, antigripal (SANTOS, 2010), anti-diarreica, anti-sifilica, anti-gonorreica, anti-reumatóide, anti-helmíntica, anti-pirética (D'ANGELIS; NEGRELLE, 2014), calmante, digestiva e regulatória menstrual (LEGRAND; KLEIN, 1978 apud LANDRUM, 1986).

Figura 9 - Aguardente Cataia aromatizada com folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (*Myrtaceae*) e artesanalmente produzida por mulheres caiçaras da Ilha do Superagui - Paraná.



Fonte: D'ANGELIS (2013).

1.1.1.3.3 Estudos fitoquímicos

Os esforços para a devida caracterização botânica de *P. pseudocaryophyllus* têm sido complementados por estudos fitoquímicos da espécie, cujos objetivos são detectar, isolar e identificar seus constituintes. Desde o estudo pioneiro de Craveiro et al. (1981), mais de 60 compostos voláteis foram identificados apenas nas prospecções fitoquímicas de óleos essenciais (OE) extraídos das folhas de *P. pseudocaryophyllus*. Em sua maioria de natureza terpênica ou fenólica (PAULA et al., 2012), substâncias como (*E*)-metiliso Eugenol, eugenol, geranial/neral, (*E*)-cariofileno e chavibetol destacam-se por estarem presentes como constituintes majoritários nestes OE, segundo relatos de diversos pesquisadores, listados em ordem cronológica na Tabela 3.

Tabela 3 – Estudos fitoquímicos realizados com a espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).

Referência	Material (Método extrativo) Sítio de coleta	[Amostra/Método analítico] - Compostos identificados
Craveiro et al. (1981)	Folhas (hidrodestilação) Nordeste, BR.	[OEs/CG-MS] - Eugenol.
Lullez (1991)	Folhas (hidrodestilação) Paraná, BR.	[OEs/CG-MS] – Metileugenol, eugenol e chavibetol.
Nakaoka Sakita et al. (1994)	Folhas (hidrodestilação) Campos de Jordão, SP.	[OEs/CG-MS] – Geranial (34,26%), neral (27,85%), linalol (5,18%), geraniol (4,82%), β -cariofileno (4,40%), β -pineno (2,67%), 6-metil 5-hepteno 2-ona (1,58%), α -copaeno (1,55%), δ -cadineno (1,38%) e α -pineno (1,35%).
Paula (2006)	Folhas (hidrodestilação) São Gonçalo do Abaeté, MG.	[OEs/CG-MS] – Geranial (36,56-47,2%), neral (21,41-33,6%), óxido de cariofileno (3,4-13,53%).
	Brasília, DF.	[OEs/CG-MS] - (<i>E</i>)-metiliseugenol (78-93,6%), metileugenol (3,1-18,1%) e eugenol (71,9%).
Lima et al. (2006)	Folhas (hidrodestilação) Ilha do Cardoso, SP.	[OEs/CG-MS] - Eugenol (71,9%).
	Piranapiacaba, SP	[OEs/CG-MS] - Metiliseugenol (94,6%) e estragole (1%).
Santos et al. (2009)	Folhas (hidrodestilação) Ilha Comprida, SP.	[OEs/CG-MS] - Chavibetol (35,3%), metiliseugenol (11,3%) e compostos mono e sequiterpênicos.
Marques F. et al. (2010)	Folhas (hidrodestilação) Ilha Comprida, SP.	[OEs/CG-MS] - Chavibetol (70,90%), metiliseugenol (20,7%) e o-cimeno (2,8%).
Custódio et al. (2010)	Folhas (hidrodestilação) São Jerônimo da Serra, PR.	[OEs/CG-MS] - Eugenol (92,59%), metiliseugenol, terpinen-4-ol, o-cimeno e (<i>E</i>)-cariofileno.
Santos (2010)	Folhas Ilha Comprida, SP. <i>Amostra 1; 2 e 6</i>	[OEs/CG-MS] - Chavibetol (68,6%; 34,1% e 32%).
	Cananéia, SP. <i>Amostra 3</i>	[OEs/CG-MS] – Eugenol (47,4%).
	<i>Amostra 4</i>	[OEs/CG-MS] – (5,5)- α -farneseno (15,8%).
	<i>Amostra 5</i>	[OEs/CG-MS] – Chavibetol (47,4%).
	Ilha do Cardoso, SP. <i>Amostra 7</i>	[OEs/CG-MS] – Chavibetol (26,2%).
	<i>Amostras 1-7</i>	[OEs/CG-MS] - E, ainda, metileugenol, o-cimeno, terpinoleno e 1,8-cineol.

Cont. Tabela 3 – Estudos fitoquímicos realizados com a espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).

Referência	Material (Método extrativo) Sítio de coleta	[Amostra/Método analítico] - Compostos identificados
Paula et al. (2011)	Folhas (hidrodestilação) São Gonçalo do Abaeté, MG. <i>Amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8</i>	[OEs/CG-MS] – α -tujeno, β -pineno, 6-metil-5-heptan-2-ona, dihidro-1,8-cineol, limoneno, (E)- β -ocimeno, linalol, n-nonanal, <i>exo</i> -isocitral, (Z)-isocitral, (E)-isocitral, α -terpineol, citronelol, nerol, neral, geraniol, geranial, metilgeranato, α -cubebeno, α -copaeno, geranilacetato, β -bourboneno, β -elemeno, metileugenol, β -gurjuneno, (E)-cariofileno, β -capaeno, aromadendreno, (Z)-metiliso Eugenol, α -humuleno, 9- <i>epi</i> -(E)-cariofileno, aloaromadendreno, <i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno, γ -muroleno, <i>trans</i> -murolo-4(14),5-dieno, (E)-metiliso Eugenol, biciclogermacreno, α -muroleno, γ -cadineno, δ -cadineno, elemicina, espatulenol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, murolo-4,10(14)-dien-1-b-ol, α -murolol, 14-hidroxi-(Z)-cariofileno.
	São José do Barreiro, MG. <i>Amostras 9, 10, 11</i>	[OEs/CG-MS] – limoneno, 1,8-cienol, (E)- β -ocimeno, linalol, 2-metilbutil-2-metilbutirato, α -terpineol, neral, geraniol, geranial, α -copaeno, β -elemeno, metileugenol, (E)-cariofileno, β -capaeno, (Z)-metiliso Eugenol, α -humuleno, γ -muroleno, γ -himachaleno, (E)-metiliso Eugenol, α -muroleno, γ -cadineno, δ -cadineno, elemicina, espatulenol, óxido de cariofileno, globulol, (Z)-asarona, 5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - α -eudesmol, 1- <i>epi</i> -cubenol, 1,10-di- <i>epi</i> -cubenol, <i>epi</i> - α -murolol, α -murolol, (E)-asarona.
	Brasília, DF. <i>Amostra 12</i>	[OEs/CG-MS] – α -copaeno, metileugenol, (E)-cariofileno, (Z)-metiliso Eugenol, (E)-metiliso Eugenol, δ -cadineno.
Fajemiroye et al. (2012b)	Folhas (hidrodestilação) São Gonçalo do Abaeté, MG.	[OEs/CG-MS] – α -copaeno, metileugenol, (E)-cariofileno, (Z)-metiliso Eugenol, (E)-metiliso Eugenol, δ -cadineno.
Paula et al. (2012)	Folhas (hidrodest./maceração) São Gonçalo do Abaeté, MG <i>Quimiotipo (E)-metiliso Eugenol</i>	[OEs/CG-MS] – α -copaeno, metileugenol, (E)-cariofileno, (Z)-metiliso Eugenol, (E)-metiliso Eugenol, δ -cadineno.
		[EE _F /CLAE] – (E)-metiliso Eugenol, lupeol, α -amirina, β -amirina, ác. oleanólico, ác. ursólico, ac. betulínico, quercitrina, isoquercitrina, catequina, afzelina, avicularina, guajaverina, quercetina 3-O- β -arabinopiranosida e ácido gálico.

Cont. Tabela 3 – Estudos fitoquímicos realizados com a espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).

Referência	Material (Método extrativo) Sítio de coleta	[Amostra/Método analítico] - Compostos identificados
Paula et al. (2012)	Folhas (hidrodest./maceração) São Gonçalo do Abaeté, MG <i>Quimiotipo (E)-metiliso Eugenol</i>	[OEs/CG-MS] – α -copaeno, metileugenol, (E)-cariofileno, (Z)-metiliso Eugenol, (E)-metiliso Eugenol, δ -cadineno. [EE _F /CLAE] – (E)-metiliso Eugenol, lupeol, α -amirina, β -amirina, ác. oleanólico, ác. ursólico, ac. betulínico, quercitrina, isoquercitrina, catequina, afzelina, avicularina, guaijaverina, quercetina 3-O- β -arabinopiranosida e ácido gálico. <i>Quimiotipo citral</i> [OEs/CG-MS] – (2E)-hexenol, α -tujeno, Alil isovalerato. β -pineno, 6-Metil-5-hepten-2-ona, dehydro-1,8-cineole, linalol, exo-isocitral, (Z)-isocitral, (E)-isocitral, nerol, neral, geraniol, geranial, α -copaeno, β -bourboneno, β -elemeno (E)-cariofileno, α -copaeno, aromadendreno, α -humuleno, (Z)-metiliso Eugenol, alo-aromadendreno, γ -muurolene, (E)-metiliso Eugenol, γ -cadineno, δ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno e epóxido de humuleno II. [EE _F /CLAE] – Lupeol, α -amirina, β -amirina, ác. oleanólico, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, catequina, afzelina, ácido elágico e ácido gálico.
El Assal et al. (2014)	Folhas (maceração) São Gonçalo do Abaeté, MG.	[EE _B /CLAE] – Catequina e quercitrina.
Campanini et al. (2014)	Folhas (maceração) São Jerônimo da Serra, PR.	[EE _B /CLAE] – Eugenol, rutina e ácido tânico.
Suzuki et al. (2014)	Folhas (hidrodestilação) Lazlo Aromatologia Ltda.	[OEs/CG-MS] – Eugenol (88,6%), β -cariofileno (4,8%), acetato de eugenol (1%) e 1,8-cineol (0,7%).
Ribeiro et al. (2015)	Folhas (Hidrodestilação) Ilha Comprida, SP.	[OEs/CG-MS] – Chavibetol (38,14%), metileugenol (11,35%), terpinoleno (9,17%), p-cimeno (8,21%), α -felandreno (5,94%), 1,8-cineol (3,93%), γ -terpineno (3,79%), β -(E)-ocimeno (2,80%), α -pineno (2,59%), δ -3-careno (2,51%), canfeno (2,19%), terpinen-4-ol (1,73%), mirceno (1,31%), limoneno (1,31%), α -terpineno (1,16%), β -felandreno (0,95%), β -pineno (0,90%), eugenol (0,48%), p-cimeno-8-ol (0,48%) e linalol (0,17%).

Legenda: 1. As coletas em Ilha Comprida – SP foram realizadas em agosto de 2006, agosto 2007 e maio de 2008.
Abreviaturas: OEs - Óleos essenciais, EE_F - Frações do extrato etanólico bruto, EE_B - Extrato etanólico bruto.

Nos poucos estudos dedicados à análise do extrato etanólico bruto (EE_B) ou de suas frações (EE_F) orgânicas e inorgânicas (PAULA et al., 2012; CAMPANINI et al., 2014), foram identificados flavonoides como a catequina, a quercitrina e a rutina e taninos como os ácidos gálico, elágico e tânico. A presença de compostos terpênicos e fenólicos, como o lupeol e o eugenol, recorrentes nos óleos essenciais, foram confirmadas nas análises dos extratos brutos (Tabela 3).

Como mostra a Tabela 3, até o momento apenas foi descrita a fitoquímica das folhas de espécimes de *P. pseudocaryophyllus* coletados nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e no Distrito Federal. A escolha da técnica de extração dos óleos essenciais por hidrodestilação com aparato de Clevenger foi unânime nos estudos, bem como da técnica de maceração quando produzidos os extratos etanólicos brutos. Quando extraído o óleo essencial, a identificação de seus constituintes foi realizada pela combinação das técnicas de cromatografia gasosa (CG) seguida de espectrometria de massas (MS), enquanto que os extratos etanólicos brutos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (CAMPANINI et al., 2014) ou purificados por cromatografia em coluna, tendo seus principais componentes caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) (PAULA et al., 2012).

Ao identificar compostos nos extratos etanólico brutos e óleos essenciais, as prospecções fitoquímicas de *P. pseudocaryophyllus* não apenas fornecem valiosas informações que ajudam a compreender alguns usos etnofarmacológicos da espécie, como também ampliam e embasam o entendimento de seus efeitos farmacológicos e toxicológicos potenciais.

1.1.1.3.4 Estudos farmacológicos

Para corroborar e complementar todos os avanços nos conhecimentos etnofarmacológicos, botânicos e fitoquímicos acumulados sobre a espécie *P. pseudocaryophyllus*, estudos realizados na última década têm identificado um amplo potencial farmacológico após análises das folhas dessa planta medicinal. Entre as propriedades terapêuticas de *P. pseudocaryophyllus* cientificamente avaliadas estão inclusas as seguintes atividades farmacológicas: ansiolítica, antidepressiva (FAJEMIROYE et al. 2012 a, b, 2013), antioxidante/anti-inflamatória (CAMPANINI et al., 2013, 2014), antinociceptiva/anti-inflamatória (PAULA et al., 2012) e antibacteriana e antifúngica (LIMA et al., 2006; PAULA et al., 2009; CUSTÓDIO et al., 2010; SANTOS, 2010; FERNANDES et al., 2012; EL ASSAL et al., 2014; SUZUKI et al., 2014; YOKOMIZO; NAKAOKA-SAKITA, 2014).

Além do vasto potencial para exploração comercial pela indústria farmacêutica, estudos têm demonstrado que a espécie *P. pseudocaryophyllus* apresenta, ainda, aplicabilidade para a indústria química como um agente natural com propriedades larvicida e inseticida (ACIOLE, 2009; PAVARINI; ANSANTE; CACERES, 2010; RIBEIRO et al., 2015).

1.1.1.3.4.1 Propriedades antimicrobianas

A atividade antimicrobiana das folhas de *P. pseudocaryophyllus* é sua propriedade farmacológica que mais relatos acumula na literatura. Até o momento, diversos estudos analisaram as ações antibacteriana e antifúngica de seus OE e de seu extrato etanólico, como mostram as tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 – Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos das folhas da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).

MICROORGANISMO	MÉTODO	CEPA	CIM (µg/mL) ou Halo (mm)	REFERÊNCIA
Bactérias Gram +				
<i>Staphylococcus aureus</i>	Microdiluição	ATCC 6538	>1000/250*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 25923	>1000/125*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 25923	17	CUSTODIO et al. (2010)
	Microdiluição	ATCC 25923	0,0015/47x10 ⁻⁶ **	LIMA et al. (2006)
	Difusão em ágar	ATCC 25923	R	SANTOS (2010)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Microdiluição	ATCC 12229	>1000/125*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 12228	R	SUZUKI et al. (2014)
<i>Corynebacterium xerosis</i>	Microdiluição	IAL 105	1000	SUZUKI et al. (2014)
<i>Bacillus subtilis</i>	Microdiluição	ATCC 8272	17	CUSTODIO et al. (2010)
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	Microdiluição	ATCC 7468	500	SUZUKI et al. (2014)
<i>Micrococcus luteus</i>	Microdiluição	ATCC 9341	>1000/125*	PAULA et al. (2012)
<i>Micrococcus roseus</i>	Microdiluição	ATCC 1740	>1000/125*	PAULA et al. (2012)
<i>Bacillus cereus</i>	Microdiluição	ATCC 14579	>1000/62,5*	PAULA et al. (2012)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Microdiluição	ATCC 6633	>1000/125*	PAULA et al. (2012)
Bactérias Gram -				
<i>Escherichia coli</i>	Microdiluição	ATCC 8739	>1000/>1000*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 11229	>1000/>1000*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 25922	17	CUSTODIO et al. (2010)
	Microdiluição	ATCC 25922	0,048/0,048**	LIMA et al. (2006)
	Difusão em ágar	ATCC 25922	21	SANTOS (2010)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Microdiluição	CI	>1000/>1000*	PAULA et al. (2012)

Cont. Tabela 4 – Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos das folhas da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).

MICROORGANISMO	MÉTODO	CEPA	CIM (µg/mL) ou Halo (mm)	REFERÊNCIA
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Microdiluição	ATCC 13048	>1000/>1000*	PAULA et al. (2012)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Difusão em ágar	ATCC 29212	R	SANTOS (2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Microdiluição	ATCC 27483	>1000/>1000*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	CI	>1000/>1000*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 27853	66	CUSTODIO et al. (2010)
	Microdiluição	ATCC 9027	0,048/0,048**	LIMA et al. (2006)
	Difusão em ágar	ATCC 27853	R	SANTOS (2010)
	Difusão em ágar	ATCC 110699	R	SANTOS (2010)
<i>Serratia marcescens</i>	Microdiluição	ATCC 14756	>1000/>1000*	PAULA et al. (2012)
<i>Salmonella spp.</i>	Microdiluição	ATCC 19430	>1000/>1000*	PAULA et al. (2012)
<i>Proteus hauseri</i>	Microdiluição	ATCC 13315	500	SUZUKI et al. (2014)
Fungos				
<i>Candida albicans</i>	Microdiluição	CI	>500/500*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	CI	4	CUSTODIO et al. (2010)
	Microdiluição	ATCC 10231	0.024/0,048**	LIMA et al. (2006)
	Microdiluição	CI	>256	EL ASSAL et al. (2014)
	Microdiluição	ATCC 90028	2250	SANTOS (2010)
	Microdiluição	ATCC 76615	2250	SANTOS (2010)
	Difusão em ágar	ATCC 90028	35	SANTOS (2010)
	Difusão em ágar	ATCC 76615	35	SANTOS (2010)
<i>Candida parapsilosis</i>	Microdiluição	CI	>500/500*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 22019	>500/500*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 22019	2250	SANTOS (2010)
	Difusão em ágar	ATCC 22019	>35	SANTOS (2010)
<i>Candida krusei</i>	Microdiluição	CI	4	CUSTODIO et al. (2010)
	Microdiluição	ATCC 6258	1125	SANTOS (2010)
	Difusão em ágar	ATCC 6258	38	SANTOS (2010)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Microdiluição	ATCC 28957	125/15,6*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	CI	250/62,5*	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	CI	250/62,5*	PAULA et al. (2012)

Legenda: * CIM (µg/mL) para o óleo essencial extraído do quimiotipo (*E*)-metilisoeugenol/ CIM (µg/mL) para o óleo essencial extraído do quimiotipo citral; ** CIM (µg/mL) para espécime coletado em Paranapiacaba, SP/ CIM (µg/mL) para espécime coletado em Ilha do Cardoso, SP;
Abreviaturas: CIM – Concentração inibitória mínima; CI – Clinicamente isolada; R – Resistente; IAL – Instituto Adolfo Lutz.

Ao analisar a atividade antimicrobiana dos OE de *P. pseudocaryophyllus* sobre fungos filamentosos clinicamente isolados utilizando o método de difusão em ágar, Custódio et al. (2010) verificaram que na maior concentração de OE testada, que foi de 4 mg/placa, entre 40 e 80% do crescimento das micelas de *Botryosphaeria rhodina* e *Fusarium verticillioides* foi interrompido. As micelas de *Lasiodiplodia theobromae* tiveram seu crescimento interrompido

entre 20 e 40%, enquanto entre 10 e 20% das micelas de *Botryosphaeria ribis* também pararam de crescer. Já pelo método de autobiografia em CCD, o fungo *Claudosporium herbarum* mostrou-se fortemente inibido pela atividade do eugenol presente nos OE de *P. pseudocaryophyllus* testados. Yokomizo e Nakaoka-Sakita, (2014), por sua vez, também analisaram o potencial antimicrobiano dos OE extraídos das folhas de dois espécimes de *P. pseudocaryophyllus* pelo método de difusão em ágar. Neste estudo, verificou-se que o espécime procedente de Campos do Jordão – SP tinha atividade antimicrobiana bem superior ao espécime coletado em Itaquaquecetuba – SP, indicando a ocorrência de polimorfismo químico. Na média, os OE de *P. pseudocaryophyllus* apresentaram forte atividade contra a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* e contra os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium verrucosum*, sem, contudo, serem capazes de inibir expressivamente o crescimento de *Escherichia coli*.

Acredita-se que os diferentes níveis de atividade antimicrobiana apresentados pelos óleos essenciais extraídos da espécie *P. pseudocaryophyllus* estejam relacionados às variações em suas composições químicas e na concentração de alguns de seus constituintes com propriedades antibacteriana e antifúngica conhecidas, como o eugenol (CUSTÓDIO et al., 2010; SUZUKI et al., 2014;), o citral, o ácido oleanólico, o ácido elágico (PAULA et al., 2012) e os flavonoides catequina e quercitrina (El ASSAL et al., 2014).

Tabela 5 – Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos obtidos das folhas da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).

MICROORGANISMO	MÉTODO	CEPA	CIM (µg/mL) ou Halo (mm)	REFERÊNCIA
Bactérias Gram +				
<i>Staphylococcus aureus</i>	Microdiluição	ATCC 6538	1000/500 ¹	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 25923	1000/500 ¹	PAULA et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 29213	17/19/17 ³	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 29213	0,39/0,78/0,39 ⁴	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	CI	0,78/1,56/0,78 ⁴	PAULA et al. (2009)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Microdiluição	ATCC 12229	1000/1000 ¹	PAULA et al. (2012)
<i>Micrococcus luteus</i>	Microdiluição	ATCC 9341	1000/500 ¹	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 9341	0,78/1,56/0,78 ⁴	PAULA et al. (2009)
<i>Micrococcus roseus</i>	Microdiluição	ATCC 1740	1000/500 ¹	PAULA et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 1740	27/29/28 ³	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 1740	0,78/0,78/0,78 ⁴	PAULA et al. (2009)
<i>Bacillus cereus</i>	Microdiluição	ATCC 14579	1000/500 ¹	PAULA et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 14579	16/18/16 ³	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 14579	0,39/0,78/0,39 ⁴	PAULA et al. (2009)
<i>Bacillus atropheus</i>	Microdiluição	ATCC 6633	1000/500 ¹	PAULA et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 6633	14/16/14 ³	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 6633	1.56/1,56/1.56 ⁴	PAULA et al. (2009)

Cont. Tabela 5 – Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos obtidos das folhas da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).

MICROORGANISMO	MÉTODO	CEPA	CIM (µg/mL) ou Halo (mm)	REFERÊNCIA
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Difusão em ágar	ATCC 1262	13/15/13 ³	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 1262	0,78/1,56/0,78 ⁴	PAULA et al. (2009)
Bactérias Gram -				
<i>Escherichia coli</i>	Microdiluição	ATCC 8739	>1000/>1000 ¹	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 11229	>1000/>1000 ¹	PAULA et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 8739	0/0/0 ³	PAULA et al. (2009)
	Difusão em ágar	ATCC 25922	0/0/0 ³	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 8739	12,5/1,56/1.56 ⁴	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 25922	SE/25/25	PAULA et al. (2009)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Microdiluição	CI	>1000/>1000 ¹	PAULA et al. (2012)
	Difusão em ágar	HMA/FT502	0/0/0 ³	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	HMA/FT502	3,12/12.5/1.56 ⁴	PAULA et al. (2009)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Microdiluição	ATCC 13048	>1000/>1000 ¹	PAULA et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 13048	0/0/0 ³	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	HMA/FT502	12,5/25/1.56 ⁴	PAULA et al. (2009)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Microdiluição	ATCC 27483	1000/1000 ¹	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	CI	1000/1000 ¹	PAULA et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 9027	13/12/13 ³	PAULA et al. (2009)
	Difusão em ágar	ATCC 27253	13/15/16 ³	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 9027	3,12/1,56/1.56 ⁴	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 27253	0,39/1,56/0,78 ⁴	PAULA et al. (2009)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Microdiluição	CI	0,39/1,56/0,78 ⁴	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 27253	0,78/1,56/0,78 ⁴	PAULA et al. (2009)
<i>Serratia marcescens</i>	Microdiluição	ATCC 14756	>1000/>1000 ¹	PAULA et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 14756	15/14/15 ³	PAULA et al. (2009)
<i>Salmonella spp.</i>	Microdiluição	ATCC 19430	1000/1000 ¹	PAULA et al. (2012)
Fungos				
<i>Candida albicans</i>	Microdiluição	CI	125/62,5 ¹	PAULA et al. (2012)
	Difusão em ágar	ATCC 1023	T/T/T ³	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	ATCC 1023	0,19/0,19/0,19 ⁴	PAULA et al. (2009)
	Microdiluição	CI	256	EL ASSAL et al. (2014)
<i>Candida parapsilosis</i>	Microdiluição	CI	62,5/31,2 ¹	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 22019	62,5/31,2 ¹	PAULA et al. (2012)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Microdiluição	ATCC 28957	15.6/15,6 ¹	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	CI	125/7,8 ¹	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	CI	125/15,6 ¹	PAULA et al. (2012)
	Microdiluição	ATCC 32045	64 ²	FERNANDES et al. (2012)
	Microdiluição	CI	64 ²	FERNANDES et al. (2012)

Legenda: 1. CIM (µg/mL) para o extrato etanólico obtido do quimiotipo (*E*)-metilisoeugenol/ CIM (µg/mL) para o extrato etanólico obtido do quimiotipo citral; 2 CIM de 64 µg/mL tanto para *C. neoformans* melanizados, quanto não melanizados; 3. Halo, em mm, para o extrato I (coleta em Brasília, abril de 2005)/ para o extrato II (coleta em Brasília, setembro de 2005/ para o extrato III (coleta em São Gonçalo do Abaeté, Julho de 2000); 4. CIM, µg/mL, para o extrato I (coleta em Brasília, abril de 2005)/ para o extrato II (coleta em Brasília, setembro de 2005/ para o extrato III (coleta em São Gonçalo do Abaeté, Julho de 2000)

Abreviaturas: CIM – Concentração inibitória mínima; CI – Clinicamente isolada; T – Traços de inibição do crescimento; SE – Sem efeito.

Quando analisada a atividade antimicrobiana das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa obtidas a partir do extrato etanólico bruto de dois quimiotipos de *P. pseudocaryophyllus*, (*E*)-metiliseugenol e citral, Paula et al. (2012) verificaram que apenas as frações diclorometano de ambos os quimiotipos apresentaram moderada ação antimicrobiana (CIM: 250 a 500 µg/mL) sobre as bactérias Gram positivas testadas e nenhuma fração teve efeito sobre as bactérias Gram negativas. Por outro lado, vários níveis de ação antifúngica sobre *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans* puderam ser identificados, com destaque para o potencial apresentado pelas frações hexano (CIM: 15,6 a 62,5 µg/mL) e aquosa (CIM: 7,8 a 62,5 µg/mL) do quimiotipo (*E*)-metiliseugenol e pelas frações acetato de etila (CIM: 7,8 a 31,2 µg/mL) e aquosa (CIM: 15,6 a 62,5 µg/mL) do quimiotipo citral. Tais propriedades antifúngicas também foram verificadas por El Assal et al. (2014), que observaram inibição do crescimento, redução na aderência às células epiteliais e na formação de hifas em 12 isolados de *C. albicans* e *C. parapsilosis* após exposição às frações aquosa e acetato de etila obtidas das folhas de *P. pseudocaryophyllus*, quimiotipo citral. Em resumo, para El Assal e colaboradores, as frações aquosa e acetato de etila, bem como o extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus* demonstram ação antifúngica, induzem alterações metabólicas, causam lesões nas membranas e reduzem a expressão de fatores de virulência em fungos, podendo, portanto, ser fonte para desenvolvimento de novos agentes antimicóticos.

1.1.1.3.4.2 Propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante.

Além das propriedades antimicrobianas, estudo realizado por Paula et al. (2012) investigou a ação dos extratos etanólicos brutos obtidos das folhas de *P. pseudocaryophyllus* em modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Como resultado foi verificado que tanto o quimiotipo citral quanto o (*E*)-metiliseugenol apresentaram propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva, possivelmente atribuídas à presença de compostos analgésicos e anti-inflamatórios em seus extratos, como lupeol, α -amirina, β -amirina, quercetina, quercitrina e afzelina.

A ação anti-inflamatória do extrato etanólico bruto obtido das folhas de *P. pseudocaryophyllus* também foi descrita por Campanini et al. (2013, 2014) que testaram a capacidade de duas formulações tópicas lipídicas, incorporadas ao extrato de *P.*

pseudocaryophyllus, de reverterem o processo inflamatório e oxidativo instalado na pele irradiada por raios ultra-violeta B (UV-B). De forma significativa, as formulações contendo o extrato não só reduziram o edema como também combateram o surgimento de diversos fatores pró-inflamatórios e oxidativos deletérios à pele dos camundongos testados, inibindo a atividade de mieloperoxidases e da matriz metaloprotease e a produção de interleucina-1 β e de ânion superóxido. Por fim, ambas as formulações testadas não só aumentaram a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNA_m) para glutathione redutase, como também inibiram a depleção dessa enzima antioxidante.

1.1.1.3.4.3 Atividade sobre o sistema nervoso central

A capacidade do extrato etanólico bruto obtido das folhas de *P. pseudocaryophyllus* (EPP_m), bem como de suas frações aquosa (FA), hexano (FH), diclorometano (FD) e acetato de etila (FAE) apresentarem atividade sobre o sistema nervoso central (SNC) foi avaliada em estudo desenvolvido por Fajemiroye et al. (2012a). Nesse estudo, a avaliação do tempo de sono induzida por barbitúricos foi realizada pela administração de pentobarbital 40 mg/kg a camundongos suíços, 60 minutos após terem sido tratados com o extrato e suas frações por via oral (EPP_m: 1g/kg; FA: 0,64 g/kg; FEA: 0,42 g/kg; FD: 0,25 g/kg; FH: 0,16 g/kg). Os resultados mostraram que apenas a FD não foi capaz de reduzir a latência do sono, enquanto o EPP_m, a FA e a FD aumentaram o tempo de sono nos camundongos quando comparados ao grupo controle. No teste de campo aberto, também realizado 60 minutos após a administração de EPP_m e suas frações, com as mesmas doses adotadas na avaliação do tempo de sono, a FA mostrou efeito sedativo verificado pela redução do número de cruzamentos totais e pelo aumento no tempo de congelamento. Por outro lado, os camundongos tratados com FD ficaram mais tempo no centro do campo aberto sem quaisquer sinais de incoordenação motora, um resultado indicativo de ação ansiolítica.

Em investigação subsequente do potencial ansiolítico da FD, administrada oralmente a camundongos suíços machos, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, Fajemiroye et al. (2012b) sugeriram que a atividade ansiolítica identificada pudesse ter sido mediada pela ação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}. Isso porque os camundongos tratados com FD exibiram comportamentos ansiolíticos nos testes do labirinto em cruz elevado e transição claro e escuro que não puderam ser bloqueados pelo tratamento prévio dos camundongos com flumazenil (2 mg/kg), 30 min antes da administração de FD e 90 minutos antes dos testes comportamentais. Por outro lado, o tratamento prévio com o antagonista serotoninérgico NAN-

190 na dose de 0,5 mg/kg reverteu completamente os efeitos ansiolíticos dessa fração. Diante destes resultados, Fajemiroye e colaboradores sugerem que os efeitos ansiolíticos da FD obtida do extrato etanólico das folhas de *P. pseudocaryophyllus* podem estar relacionados à neurotransmissão serotoninérgica, com envolvimento, portanto, dos receptores do tipo 5-HT_{1A}.

Adicionalmente, em análise do efeito antidepressivo da FD, administrada por via oral a camundongos suíços machos nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, Fajemiroye et al. (2013) verificaram uma redução significativa no tempo de imobilidade dos animais tratados com 125 e 250 mg/kg quando comparados ao grupo controle, tanto no teste de nado forçado, quanto no teste de suspensão pela cauda. Todavia, esse efeito não se mostrou diretamente relacionado com a dose, não sendo observado nos animais tratados com 500 mg/kg de FD. Importante ressaltar que os efeitos antidepressivos da FD observados no teste de nado forçado foram completamente revertidos em animais previamente tratados com paraclorofenilalanina, um agente depletor de monoaminas, como a serotonina. Por outro lado, no teste de campo aberto, os animais tratados com 500 mg/kg de FD reduziram significativamente o número de cruzamentos e levantamentos, assim como os animais tratados com diazepam (5 mg/kg), o que configura mais um indicio da atividade ansiolítica da FD. Por fim, ao mensurar a atividade da enzima monoamina oxidase (MAO) em soluções do tecido cerebral de camundongos decapitados 60 minutos após o tratamento prévio com FD (250 mg/kg), clorgilina (15 mg/kg) e tranilcipromina (15 mg/kg),

Fica claro, portanto, que as contribuições de Fajemiroye e colaboradores fornecem um precioso exemplo de como o conhecimento científico pode confirmar potenciais usos farmacológicos de uma planta medicinal advindos da cultura popular. Desde os relatos de Legrand e Klein (1978), a ação calmante dos chás das folhas de *P. pseudocaryophyllus* já estava tradicionalmente indicada, mostrando como os conhecimentos etnofarmacológicos podem mesmo nortear a pesquisa científica.

1.1.1.3.4.4 Propriedades larvicida e inseticida

Além de seus usos na área farmacêutica, estudos têm relatado que as folhas de *P. pseudocaryophyllus* possuem promissor potencial econômico para a indústria química, especialmente por suas propriedades inseticidas.

Em estudo que comparou o potencial larvicida dos óleos essenciais extraídos das folhas de cinco espécies da flora brasileira, Aciole (2009) verificou que a espécie *P. pseudocaryophyllus* apresentou atividade inseticida para larvas do mosquito *Aedes aegypti* sob condições experimentais, com concentrações de 44,09 ppm provocando a letalidade de 50%

das larvas após 24h de contato. Dessa forma, abre-se mais um campo de investigação para o uso da espécie *P. pseudocaryophyllus* no combate ao mosquito causador da dengue, um importante problema de saúde pública no Brasil.

Pavarini, Ansante e Caceres (2010), por sua vez, testaram a capacidade de extratos aquosos de seis espécies botânicas brasileiras repelirem a broca da bananeira (*Cosmopolites sordidus*) e, novamente, a *P. pseudocaryophyllus* destacou-se como a segunda espécie mais eficaz, perdendo apenas para o extrato aquoso obtido a partir das sementes de *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). Nesse caso, as folhas da espécie *P. pseudocaryophyllus* mostraram-se como uma potencial fonte de recursos para prevenção de perdas econômicas na agricultura, tendo em vista os grandes prejuízos causados anualmente pela *Cosmopolites sordidus* aos produtores de banana.

Recentemente, Ribeiro et al. (2015) relataram a atividade inseticida dos óleos essenciais extraídos das folhas de *P. pseudocaryophyllus* contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky, o gorgulho do milho, principal praga que atinge esse grão quando armazenado. Diante do promissor potencial comercial a ser explorado, esses pesquisadores chamaram a atenção para a necessidade de futuros estudos dedicados à elaboração de bioinseticidas baseados em derivados dos óleos essenciais de *P. pseudocaryophyllus*.

1.1.1.3.5 Estudos toxicológicos

As malformações congênitas estão entre as mais antigas preocupações humanas segundo evidências antropológicas que remontam ao terceiro milênio antes de Cristo (KALTER, 2003). Desde então, os mistérios por detrás do surgimento de anomalias em bebês têm mobilizado esforços dedicados a compreensão de suas causas, culminando no desenvolvimento de uma nova área do conhecimento, a teratologia, a ciência que estuda as anormalidades físicas presentes nos recém-nascidos (KALTER, 2003). Como um novo campo de investigação, a teratologia só passou a ocupar um lugar de destaque no meio científico internacional em meados do século XX, quando a revelação de que um medicamento antinauseante isento de prescrição e aparentemente inofensivo às gestantes teria sido a causa do nascimento de milhares de bebês com severas malformações congênitas, que passariam para a história como a geração talidomida. Fazendo vítimas em mais de 30 países, a tragédia associada ao consumo da talidomida teve repercussão e impacto suficientemente fortes para provocar a reformulação na normatização e nos critérios científicos adotados para realização de investigações toxicológicas pré-natais de substâncias

potencialmente terapêuticas, tornando obrigatória a sua realização em animais (KALTER, 2003; FINNELL, 1999). Todavia, a extrapolação para seres humanos dos dados toxicológicos obtidos em testes prévios realizados em animais de laboratório precisa reconhecer as diferenças farmacocinéticas existentes entre os mamíferos. Por exemplo, a talidomida é mal absorvida em ratos quando administrada oralmente, por isso a dose que chega ao embrião é menor. Porém, quando administrada por via parenteral, a talidomida é quase tão embriotóxica em ratos quanto em coelhos, que são mamíferos muito sensíveis aos seus efeitos teratogênicos. Sendo assim, os estudos modernos de toxicidade reprodutiva devem estar atentos a tais diferenças farmacocinéticas entre animais de laboratório e seres humanos para que possam aumentar sua capacidade de identificar teratógenos (FINNELL, 1999).

No entanto, ainda hoje, as causas de mais da metade dos casos de malformações congênicas permanecem desconhecidas e apenas cerca de 2 a 3% deles estão diretamente relacionados à ação de substâncias exógenas, os teratógenos. Ademais, apesar dos extraordinários avanços em biologia molecular e genética, a teratologia ainda não pôde celebrar nenhuma redução na incidência de nascimentos de bebês malformados ao redor do mundo. Diante disso, teratologistas contemporâneos chegam a questionar a classificação de substâncias como teratógeno ou não teratógeno, uma vez que, hoje, há o entendimento de que as causas das malformações congênicas são multifatoriais, não podendo, portanto, ser limitadas a ação de uma única substância (JELÍNEK, 2005).

Ainda assim, os seis princípios da teratologia elaborados por James. G. Wilson em 1973 não só permanecem válidos, como têm sido comprovados quase que de forma inequívoca graças aos avanços em biologia molecular (JELÍNEK, 2005). Segundo Wilson (1973), a susceptibilidade a teratógenos varia de acordo com o genótipo do embrião e com o estágio da gestação em que a exposição ocorre. Ademais, os efeitos teratogênicos são desencadeados por mecanismos primários, como a apoptose, e são dose-dependentes, estando, portanto, relacionados com a capacidade da substância exógena de atingir os tecidos do embrião em quantidade suficiente para provocar anormalidades em seu desenvolvimento, como desordens funcionais, retardamento do crescimento, malformações e morte.

Em todo caso, não se deve perder de vista o fato de que as malformações fetais induzidas por teratógenos são, em grande parte, evitáveis (FINNELL, 1999). Uma das formas de fazê-lo é garantir que gestantes só tenham contato com substâncias cujos perfis de segurança durante a gestação tenham sido previamente bem estabelecidos por estudos toxicológicos pré-clínicos, dentre eles os ensaios de toxicidade reprodutiva. Tais estudos

devem ser realizados de acordo com protocolos experimentais validados e que estejam harmonizados com as diretrizes de instituições e agências internacionalmente reconhecidas como a OMS, a *Federal and Drug Administration* (FDA), a *European Medicines Agency* (EMA), o *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), o *National Institute of Health* (NIH), a *United States Environmental Protection Agency* (EPA) and a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) (ANVISA, 2013). Dentre os protocolos internacionalmente reconhecidos voltados para avaliação de toxicidade reprodutiva em modelos animais pode-se citar como exemplos o *Guideline for reproductive toxicity risk assessment* EPA/630/R96/009 (US EPA, 1996) e o *OECD Guideline for Testing Chemicals* nº 421 (OECD, 1995).

Segundo as diretrizes do *OECD Guideline for Testing Chemicals* nº 421, de 27 de julho de 1995, intitulada *Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, adotado neste trabalho, os estudos de toxicidade reprodutiva devem ser realizados em animais saudáveis e livres de patógenos, distribuídos em grupos de, no mínimo, 10 indivíduos, que recebam ao menos três diferentes doses do xenobióticos testado pela via oral, preferencialmente. O volume administrado por *gavage* não deve exceder 1 mL/100 g da massa corporal do animal e deve ocorrer diariamente. As observações e os registros dos efeitos tóxicos nos animais de cada grupo experimental também devem ser realizadas diariamente e com frequência aumentada quando sinais clínicos de toxicidade estiverem presentes, como sangramentos e alterações comportamentais, por exemplo. As progenitoras devem ser pesadas e ter seu consumo de água e ração anotados, ao menos, semanalmente. Após serem eutanasiadas, as fêmeas e sua prole devem ser examinadas quanto à presença de anormalidades macroscópicas e/ou alterações histopatológicas. Todos os dados obtidos devem ser tabulados para posterior análise e discussão dos resultados. O período de tratamento pode anteceder ao acasalamento (Estudos de fertilidade), avançar pelo período gestacional (Estudos teratológicos) e, ainda, se estender até a lactação (Toxicidade pós-natal) (OECD, 1995).

Todavia, até o momento, não há estudos publicados que tenham investigado a toxicidade reprodutiva da espécie *P. pseudocaryophyllus*. De fato, não foram encontrados quaisquer relatos acerca de sua toxicidade pré-clínica.

Nos poucos estudos *in vivo* disponíveis, todos realizados em camundongos, há pouca informação sobre os aspectos toxicológicos de *P. pseudocaryophyllus*, mesmo porque são investigações voltadas à análise das propriedades farmacológicas dessa espécie, ou seja, norteadas para a eficácia e não, especificamente, voltadas para a segurança do uso dessa planta medicinal. Ainda assim, é possível identificar nesses estudos alguns aspectos

toxicológicos relacionados aos efeitos provocados nos animais pela administração dos extratos de *P. pseudocaryophyllus*.

Nesse sentido, Fajemiroye et al. (2012b, 2013) não relataram efeitos neurotóxicos significativos ao investigarem a ação central da fração diclorometano do extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus* em camundongos, utilizando doses orais de 125, 250 e 500 mg/kg. Tampouco, Campanini et al. (2013, 2014) relataram quaisquer reações tóxicas de toxicidade, como eritemas, em camundongos sem pelos que receberam aplicações de formulações fotoprotetoras contendo o extrato etanólico bruto de *P. pseudocaryophyllus*, em concentrações que variaram de 2-10%. No entanto, quando realizada a avaliação neurofarmacológica geral do extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus*, Fajemiroye et al. (2012a) exploraram as vias de administração oral, intraperitoneal e subcutânea, adotando as doses de 500, 1.000 e 2.000 mg/kg. Contorções abdominais, redução da capacidade exploratória e alienação foram relatadas após 10 minutos decorridos da administração intraperitoneal e 30 minutos após a administração oral das três doses testadas. A administração subcutânea do extrato bruto na dose de 2.000 mg/kg provocou redução na atividade motora espontânea e piloereção após 30 minutos. Após 60 minutos, os animais apresentaram ataxia. Os animais que receberam 2.000 mg/kg de extrato bruto pelas vias intraperitoneal e subcutânea foram a óbito em até 24h, enquanto que aqueles que receberam essa mesma dose por via oral apresentaram tremores, convulsões e alterações comportamentais que podem estar relacionadas ao efeito geral depressor do extrato bruto de *P. pseudocaryophyllus*, como também podem ser interpretadas como sinais indicativos de neurotoxicidade. Por outro lado, Paula et al. (2012) também testaram doses orais de 500, 1.000 e 2.000 mg/kg em camundongos durante a realização de estudo que investigava as propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva de *P. pseudocaryophyllus* e não relataram reações toxicológicas.

Sendo assim, fica evidente que grandes esforços têm sido direcionados para a investigação dos constituintes químicos e das propriedades farmacológicas de *P. pseudocaryophyllus*. Tais esforços dão continuidade à identificação botânica realizada por Landrum (1986) e põem à prova, sob uma perspectiva científica, os conhecimentos etnofarmacológicos acumulados de forma secular sobre essa espécie. Todavia, a lacuna nos conhecimentos sobre o perfil de segurança de *P. pseudocaryophyllus* permanece (Figura 10).

Sendo assim, este estudo propõe uma primeira avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da administração do EPP_m sobre a reprodução de ratas Wistar, mais especificamente, sobre o período da organogênese.

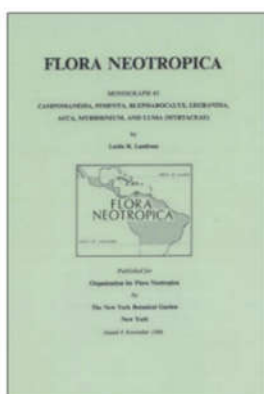
Figura 10 – Levantamento bibliográfico dos estudos voltados para investigação da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae).



Myrtus pseudocaryophyllus Gomes (1812)



Pseudocaryophyllus sericeus Berg (1856)



Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) Landrum (1986)

BOTÂNICA

Gomes (1812)
Berg (1858)
Farias (2009)
Landrum (1986)
Landrum e Kawasaki (1997)
Legrand e Klein (1978)
Lorenzi (1998; 2002)
Morgante et al. (2012)
Paula (2006)
Paula et al. (2008; 2010)
Sousa e Lorenzi (2008)

FITOQUÍMICA

Campanini et al. (2014)
Craveiro et al. (1981)
Custódio et al. (2010)
El Assal et al. (2014)
Fajemiroye et al. (2012b)
Girard (2005)
Lima et al. (2006)
Lullez (1991)
Marques et al. (2010)
Nakaoka-Sakita et al. (1994)
Oliveira (2010)
Paula (2011)
Paula et al. (2011; 2012)
Ribeiro et al. (2015)
Santos et al. (2009)
Satin (2013)
Suzuki et al. (2014)

FARMACOLOGIA

Aciole (2009)
Campanini et al. (2013; 2014)
Custódio et al. (2010)
El Assal et al. (2014)
Fajemiroye et al. (2012a; b; 2013)
Fernandes (2012)
Lima et al. (2006)
Paula (2006; 2011)
Paula et al. (2009; 2012)
Pavarini, Ansante e Caceres (2010)
Ribeiro et al. (2015)
Santos (2010)
Suzuki et al. (2014)
Yokomizo e Nakaoka-Sakita (2014)

TOXICOLOGIA



Fonte: Próprio autor (2015).

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com o extrato seco obtido das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*, quimiotipo (*E*)-metiliseugenol (EPP_m), sobre os parâmetros de toxicidade reprodutiva de ratas Wistar.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir o EPP_m pela técnica de secagem por nebulização e calcular seu rendimento;
- Avaliar o perfil cromatográfico do EPP_m por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e buscar identificar seus marcadores químicos ácido gálico, catequina, quercitrina e (*E*)-metiliseugenol;
- Avaliar os efeitos do tratamento com o EPP_m sobre a toxicidade materna;
- Analisar os parâmetros de desempenho reprodutivo das progenitoras tratadas com EPP_m;
- Avaliar o impacto do tratamento com o EPP_m sobre os parâmetros bioquímicos renais e hepáticos das progenitoras;
- Avaliar o desenvolvimento esquelético da prole de ratas Wistar tratadas com o EPP_m durante a organogênese.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material botânico

As folhas de *P. pseudocaryophyllus*, quimiotipo (*E*)-metiliseugenol, foram coletadas em 07/02/2014, no município de São Gonçalo do Abaeté, Minas Gerais, Brasil (18° 20'58,4" Sul; 45° 55'23,4" Oeste; 864 m de altitude) em região coberta pelo bioma Cerrado. A coleta das folhas foi realizada pelos Professores Doutores José Realino de Paula, Joelma Abadia Marciano de Paula e Vanessa Cristiane Santana Amaral em árvores nativas adultas, localizadas em área desmatada para formação de pastagem destinada à pecuária.

A identificação botânica das folhas foi realizada pela Prof^a. PhD. Carolyn Elinore Barnes Proença, especialista em taxonomia da família Myrtaceae e professora associada à Universidade de Brasília (UnB). As exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de Goiás (UFG), sob o número UFG27159 e no Herbário Ezechias Paulo Heringer, do Jardim Botânico de Brasília, sob o número 21.745-0.

3.2 Preparação do extrato seco

As folhas coletadas foram dessecadas a 40 °C em estufa de secagem com renovação e circulação de ar (Solab[®] SL 102/480) por 24 h e trituradas em macro moinho de rotor vertical com facas móveis e fixas (Marconi[®] MA 680), resultando em 3,137 kg de droga vegetal pulverizada.

O pó obtido foi percolado em etanol 95% P.A. a uma velocidade de 24 gotas por minuto até o seu completo esgotamento (FARMACOPEIA BRASILEIRA II, 1959). As percolações foram realizadas em percolador de vidro e ao abrigo da luz, resultando em 24 L de extrato etanólico bruto que foi, posteriormente, concentrado em rotaevaporador (IKA[®] RV 10 CONTROL) até ter seu volume inicial reduzido à metade.

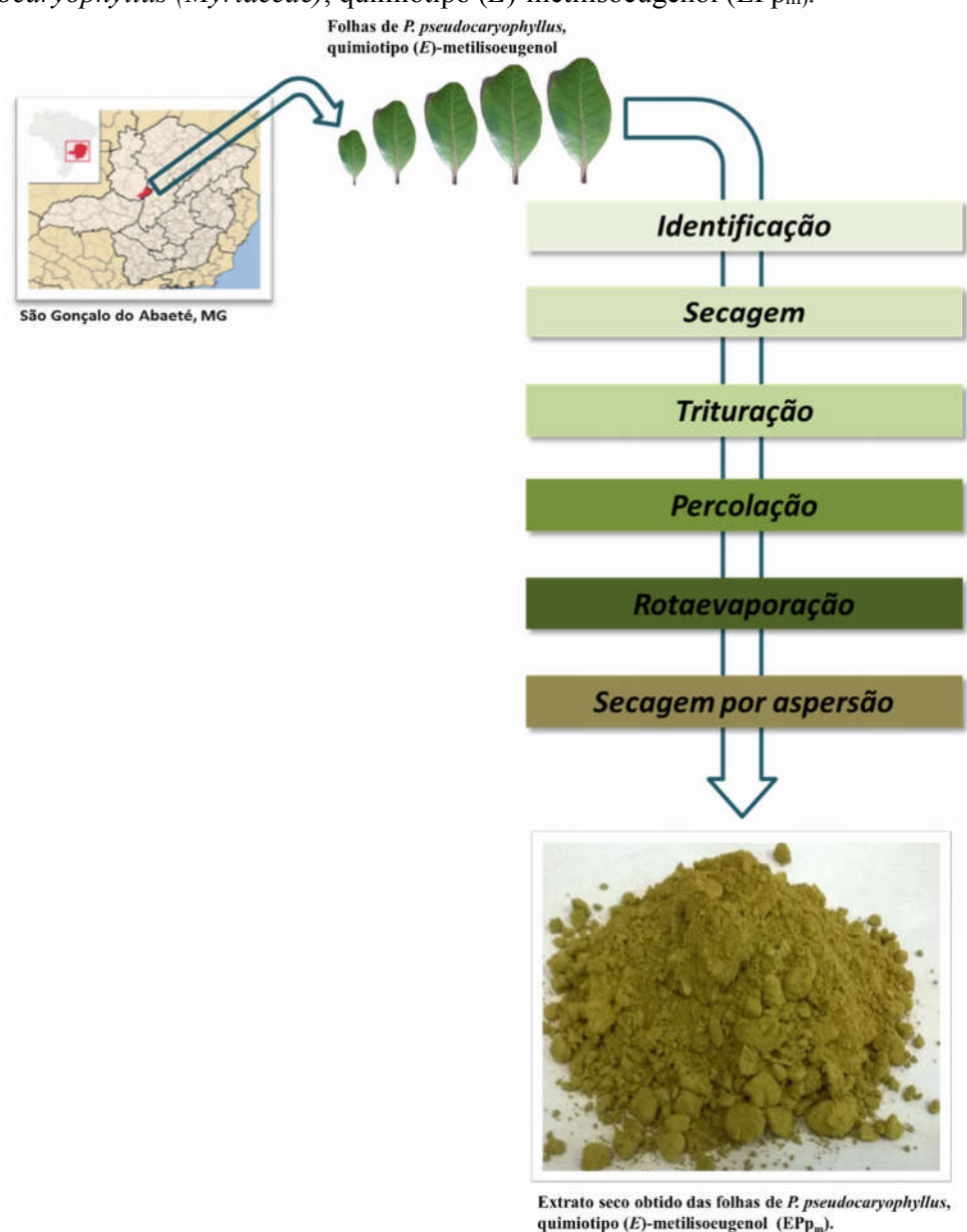
Na sequência, 12 L de extrato etanólico concentrado foram submetidos a secagem por aspersão em Spray Dryer (LABMAQ[®] do Brasil Ltda - modelo LM-MSD 1.0) de acordo com as seguintes condições: temperatura de entrada de 126 °C, temperatura de saída de 97 °C, fluxo do ar comprimido de 40 L/min⁻¹, fluxo do ar de secagem de 3,5 m³/min⁻¹, vazão do extrato de 4 mL/min⁻¹, pressão do ar comprimido de 4 kgf, diâmetro do bico de aspersão de 1,2 mm e vazão da bomba peristáltica a 0,49 mL/min.

A secagem por aspersão rendeu 391,76 g de extrato seco de *P. pseudocaryophyllus*, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (Figura 11), que foram armazenados em frascos de vidro mantidos ao abrigo da luz e da umidade. O cálculo do rendimento foi feito de acordo com a fórmula:

(1)

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Peso EPp}_m \text{ (g)}}{\text{Peso da droga vegetal pulverizada (g)}} \times 100$$

Figura 11 – Fluxograma do processo de preparação do extrato seco de *Pimenta pseudocaryophyllus* (*Myrtaceae*), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPp_m).



Fonte: Próprio autor (2015).

3.3 Perfil cromatográfico

O perfil cromatográfico do EPP_m foi obtido no cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Varian Pro Star[®], detector UV-Visível ajustado para 210 nm, injetor automático e software Star[®] da Universidade Estadual de Goiás (UEG). O método analítico adotado para todas as corridas cromatográficas previa: fluxo de 1 mL/min; volume de injeção de 10 µL; coluna analítica Supelco[®] C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm); temperatura de 25 °C e eluição da fase móvel por gradiente, conforme mostra a Tabela 6 (SARTIN, 2013).

Tabela 6 - Alterações nas proporções dos constituintes da fase móvel ao longo de um gradiente pré-definido.

Tempo (min.)	Gradiente		
	Fase Móvel		
	Acetonitrila	Metanol	Água
0	5	10	85
15	10	15	75
35	85	10	5
40	100	0	0
45	5	10	85

Os solventes orgânicos usados na fase móvel foram metanol e acetonitrila em grau cromatográfico e água obtida no sistema Millipore MilliQ-Plus. Todos os componentes da fase móvel foram desgaseificados por 15 min em banho de ultrassom sob vácuo e filtrados em membrana Millipore de 0,45µm. A solução estoque de EPP_m a 10 mg/mL (amostra) foi preparada em metanol grau cromatográfico.

Adicionalmente, foram realizadas corridas cromatográficas de amostras de padrões primários (Sigma-Aldrich[®]) de ácido gálico, dos flavonoides catequina e quercitrina e do fenilpropanoide (*E*)-metiliso Eugenol. Tais compostos, previamente identificados na espécie *P. pseudocaryophyllus* por Paula (2011), foram adotados como marcadores químicos do quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol neste estudo. A identificação no EPP_m foi realizada pela verificação direta de correspondência entre os tempos de retenção desses padrões primários com os tempos de retenção dos picos presentes na amostra do fitocomplexo.

As soluções estoque dos padrões primários utilizadas nas corridas cromatográficas foram preparadas na concentração de 0,1 mg/mL utilizando metanol grau cromatográfico como solvente.

Para a análise cromatográfica, as soluções estoque da amostra e de cada um dos padrões de referência foram filtradas em membrana Millipore de 0,45 μm e transferidas para seus respectivos *vials*. Foi acrescentado ainda, um branco (*vial* contendo apenas solvente) para excluir da análise cromatográfica quaisquer interferentes que pudessem ser provenientes do solvente ou da fase móvel.

3.4 Aspectos éticos

Todos os experimentos realizados neste estudo foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). Além disso, todos os procedimentos foram previamente analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, em 12 de setembro de 2013, sob o nº 001/2013 (ANEXO A).

3.5 Animais

Foram utilizados animais da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, cedidos pelo Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO). Os ratos fêmeas e machos foram mantidos separadamente no Biotério do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais e Sintéticos, localizado no Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás. Os animais foram alojados em caixas de polietileno (41 x 34 x 16 cm) e mantidos em condições monitoradas de temperatura (22 ± 2 °C), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 h). Foram alimentados com ração comercial (Presence®) e água potável “ad libitum”.

3.6 Acasalamento

Os ratos permaneceram alojados no biotério até atingirem a maturidade sexual (≥ 90 dias). Atingida a maturidade, as fêmeas pesando entre 190 g e 250 g foram submetidas diariamente à coleta de secreção vaginal para determinação do ciclo estral. Sempre que

identificadas em fase de pró-estro, cada fêmea era colocada na presença de um macho. Na primeira hora do ciclo claro seguinte, cada fêmea era retirada da caixa do macho e, imediatamente, submetida a coleta de secreção vaginal para confirmação da prenhez. Tais coletas foram realizadas por meio de lavagens vaginais utilizando micropipeta e solução fisiológica 0,9%.

A presença de espermatozoides observados ao exame microscópico dos esfregaços vaginais foi utilizada para confirmação da prenhez e definição do dia gestacional zero (DG 0). Nesse dia, cada fêmea prenhe foi pesada e transferida para uma caixa individual. Os procedimentos de acasalamento foram realizados até serem obtidas ao menos quarenta ratas prenhes.

3.7 Grupos experimentais e doses

As fêmeas prenhes foram distribuídas em 4 grupos experimentais. O grupo controle recebeu apenas o veículo (solução 9:1 de carboximetilcelulose 1% e propilenoglicol) durante a fase de tratamento. As progenitoras dos outros três grupos experimentais foram tratadas com o extrato seco de *P. pseudocaryophyllus*, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m), diluído em veículo nas concentrações de 2.000, 2.500 ou 3.000 mg/kg/dia. Foi utilizado o volume de administração de 0,5 mL para cada 100 g de massa corporal. Os tratamentos foram realizados por *gavage* e ocorreram diariamente nas primeiras duas horas do ciclo claro, durante o período de organogênese das ratas Wistar (DG 6-15).

As doses dos grupos tratados com EPP_m foram estabelecidas com base em um estudo prévio de toxicidade aguda realizado por nosso grupo de pesquisa com o quimiotipo citral. Nesse estudo, 12 ratas Wistar foram distribuídas em 4 grupos que receberam o extrato de *P. pseudocaryophyllus*, quimiotipo citral, nas doses de 0 (veículo), 1.000, 2.000 e 3.000 mg/kg. O tratamento foi feito por via oral (*gavage*) e realizado nas fêmeas submetidas a 12 h de jejum prévio à administração. Os animais permaneceram em observação por 14 dias, com pesagem e avaliação de sinais clínicos de toxicidade diários. Eutanasiadas ao final do 14º dia, as fêmeas tiveram os órgãos das cavidades torácica e abdominal analisados. Os resultados não revelaram nenhum sinal de toxicidade clínica ou visceral nas doses 1.000 e 2.000 mg. Apenas na dose de 3.000 mg foi verificada redução no ganho de massa corporal, um indicativo de toxicidade, segundo Chahoud et al. (1999), levando, assim, ao estabelecimento da dose de 3.000 mg/kg como dose limite no presente protocolo experimental (XAVIER et al., 2014).

A escolha da espécie animal e a definição das condições experimentais adotadas foram estabelecidas com base no protocolo nº 421 da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento/*Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) intitulado *Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test* (OECD, 1995).

3.8 Gestação

3.8.1 Ganho de massa corporal, ingestão de água e consumo de ração

Durante toda a gestação (DG 0-21), a massa corporal (g), o consumo de ração (g) e o consumo de água (mL) das progenitoras foram mensurados diariamente na primeira hora do ciclo claro.

Para o cálculo do ganho relativo de massa corporal, da ingestão relativa de água e do consumo relativo de ração foram utilizadas as fórmulas abaixo:

$$\text{Massa corporal relativa} = \frac{\text{massa corporal diária (g)}}{\text{massa corporal no DG 0 (g)}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Ingestão relativa de água} = \frac{\text{ingestão média de água (mL) no período de 3 dias} \times 100}{\text{massa corporal média (g) no período de 3 dias}} \quad (2)$$

$$\text{Consumo relativo de ração} = \frac{\text{consumo médio de ração (g) no período de 3 dias} \times 100}{\text{massa corporal média (g) no período de 3 dias}} \quad (3)$$

Adicionalmente, durante todo o período gestacional, as fêmeas foram diariamente observadas quanto a presença de sinais clínicos de toxicidade, tais como: mudanças ou alterações na pele ou no pelo, alterações nos olhos (sangramentos), nas membranas mucosas, no sistema circulatório, no sistema respiratório, no sistema nervoso central e autônomo, nos padrões comportamentais e somatomotor (OECD, 2001). No caso do surgimento de tais sinais

clínicos de toxicidade, pontos finais humanitários seriam adotados para mitigar o desconforto e o sofrimento dos animais.

3.8.2 Cesariana

Na manhã do 21º dia gestacional, logo após a pesagem e registro do consumo de ração e água, as fêmeas foram submetidas a cirurgia cesariana. Primeiramente foram anestesiadas com uma solução de uretana na dose de 0,3 mL para cada 100 g de peso corporal. Confirmado o estado de anestesia geral da progenitora, foi realizada a laparotomia seguida de uma incisão longitudinal na região alba até a cartilagem xifoide. Os cornos uterinos e os ovários foram removidos da cavidade abdominal e as fêmeas foram sacrificadas após receberem uma dose letal da solução anestésica.

Após abertura dos cornos uterinos, os fetos e suas respectivas placentas foram removidos do seu interior. Todos os fetos (F) foram examinados quanto à vitalidade, ou seja, foram registrados o número de fetos vivos (FV) e mortos (FM) em cada ninhada. Em seguida, cada feto foi separado de sua placenta e examinado quanto à presença de malformações externas visíveis. Na sequência, os fetos e as placentas foram individualmente pesados. Os cornos uterinos abertos foram inspecionados para o registro do número de sítios de implantação (SI) e de reabsorções. Para a contagem dos corpos lúteos (CL), os ovários foram separados e examinados com auxílio de um estereomicroscópio. Na ausência de fetos ou reabsorções de quaisquer tipos, a fêmea era considerada não prenhe.

Para cálculo dos índices reprodutivos de perdas pré-e pós-implantação foram utilizadas as fórmulas:

$$\text{Vitalidade} = (\text{FV}/\text{FM}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Perda pré-implantação} = (\text{CL} - \text{SI} / \text{CL}) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Perda pós-implantação} = (\text{SI} - \text{FV} / \text{SI}) \times 100 \quad (3)$$

3.9 Análises bioquímicas de parâmetros hepáticos e renais

Foram coletados 3 mL de sangue materno por meio de punção intracardíaca com seringa descartável não heparinizada. Em seguida, o sangue foi transferido para tubos de ensaio e centrifugado a 4.000 rpm por 4 minutos a 4 °C. O soro foi coletado dos tubos e armazenado a -20 °C para realização das dosagens de creatinina, ureia, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais e albumina.

As análises bioquímicas foram realizadas no aparelho Selecta XL (Vitalab®) do Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Biomedicina da PUC-GO, usando kits reagentes (Elitech®) e adotando as seguintes metodologias (Tabela 7).

Tabela 7 - Metodologias analíticas adotadas nas dosagens bioquímicas.

Parâmetro	Metodologia
Creatinina	Cinética colorimétrica - Jaffé
Ureia	Enzimático colorimétrico
TGO e TGP	Cinético - UV
FA	Cinético - Enzimático
Proteínas totais	Biureto - Colorimétrico
Albumina	Verde de Bromocresol - Colorimétrico

3.10 Análise fetal

Para a análise do desenvolvimento esquelético os fetos foram diafanizados e corados com vermelho de alizarina utilizando as técnicas adaptadas de Manson, Zenick e Costlow (1982) e Kelly e Bryden (1983). Na primeira etapa, os fetos foram desidratados utilizando-se álcool etílico 96° GL por oito dias. Na sequência, os fetos tiveram suas vísceras abdominais retiradas por uma incisão transversal feita na altura do cordão umbilical e depois foram transferidos para uma solução de hidróxido de potássio (KOH) 2% por 24 h para clareamento dos tecidos moles. Em seguida, a coloração das estruturas ósseas dos fetos foi obtida por sua

imersão em solução de KOH 0,5% adicionada de vermelho de alizarina, em quantidade suficiente para obtenção de uma solução púrpura. Após 24 h, os fetos corados permaneceram por sete dias em uma solução de glicerina 25%, sendo, por fim, fixados em glicerina 100%, completando o processo de diafanização.

Depois de corados os fetos foram analisados quanto à presença de alterações ósseas com auxílio de um estereomicroscópio. As observações de alterações esqueléticas foram registradas utilizando-se como referência o *Atlas of external and skeletal anomalies in rats* (CHAHOU, 1997) e as terminologias estabelecidas pela *International Federation of Teratology Societies* (MAKRIS et al., 2009).

3.11 Análise estatística

Os dados referentes aos parâmetros ganho de massa corporal materna (g), consumo de água (mL) e consumo de ração (g) bem como as variáveis relacionadas às análises bioquímicas e ao desempenho reprodutivo foram expressos em média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância (Anova) de uma via, seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls.

O ganho relativo de massa corporal materna, bem como os consumos relativos de água e de ração ao longo de toda a gestação foram obtidos pela aplicação das fórmulas descritas no item 2.8.1 e expressos em média. Tais dados foram submetidos à análise de variância (Anova) para medidas repetidas seguidas do teste F de comparações planejadas.

Para o tratamento estatístico dos dados obtidos da análise fetal externa e esquelética foi adotado o teste do qui-quadrado de Pearson. Nas comparações múltiplas entre os grupos foi repetido o teste do qui-quadrado de Pearson, dessa vez ajustado pela correção de Bonferroni, levando a adoção de um valor de $p \leq 0,0084$, minimizando assim o risco de rejeições indevidas da hipótese nula.

Para o tratamento estatístico dos dados, foi utilizado o software “Statistica 7.0” da Statsoft® e adotou-se, como nível mínimo de significância, o valor de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil cromatográfico do extrato seco

O extrato seco foi obtido a partir de 3.137 g de pó das folhas de *P. pseudocaryophyllus*, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol, apresentando um rendimento de 12,49%.

Para confirmar a identificação do quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol por meio do perfil cromatográfico do EPP_m (Figura 12), foi estabelecida a comparação entre os tempos de retenção de seus constituintes com os tempos de retenção de cada um dos padrões primários adotados.

Nessa comparação, foi verificada a existência de correspondência direta entre os tempos de retenção dos padrões primários ácido gálico (Figura 13), catequina (Figura 14), quercitrina (Figura 15) e (*E*)-metiliso Eugenol (Figura 16) com os tempos de retenção de quatro dentre os mais elevados picos do cromatograma do EPP_m, como mostra a Tabela 8.

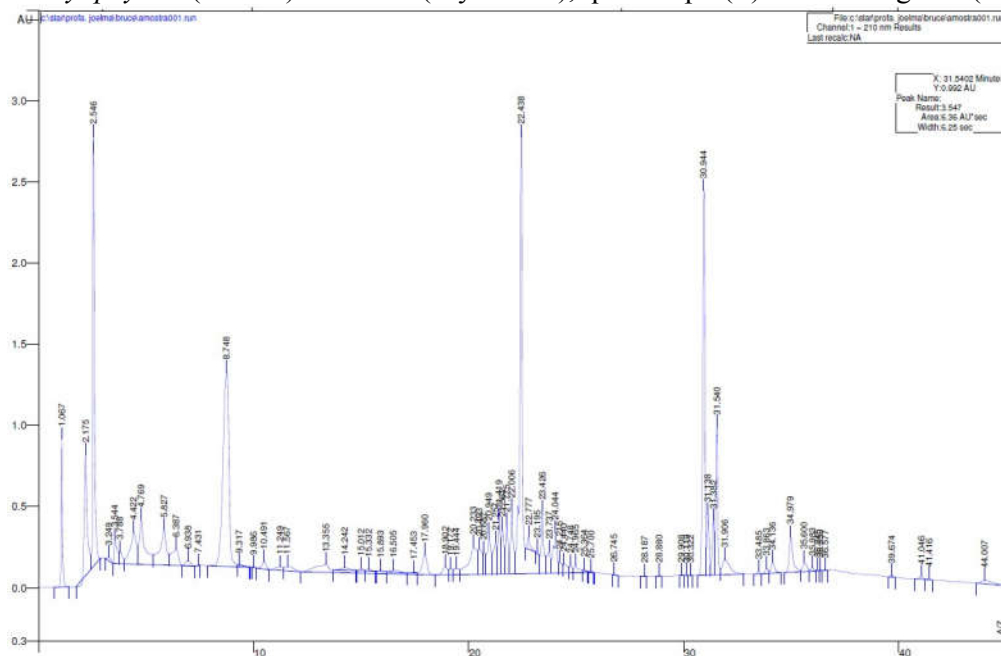
Tabela 8 - Tempos de retenção coincidentes entre os picos obtidos no cromatograma da amostra do extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m) quando comparados aos cromatogramas dos padrões primários testados

Substância de referência	Tempo de retenção para os padrões primários (minutos)	Tempos de retenção para a amostra de EPP _m (minutos)
Ácido Gálico	2.555	2.546
Catequina	8.767	8.748
Quercitrina	22.600	22.438
(<i>E</i>)-metiliso Eugenol	31.564	31.540

No cromatograma do solvente metanol (Figura 17), não foi identificada a presença de qualquer interferente que pudesse ser distinguido de meras perturbações da linha de base, especialmente no intervalo em que foram identificados os picos dos quatro padrões (2,5 a 31,6 minutos).

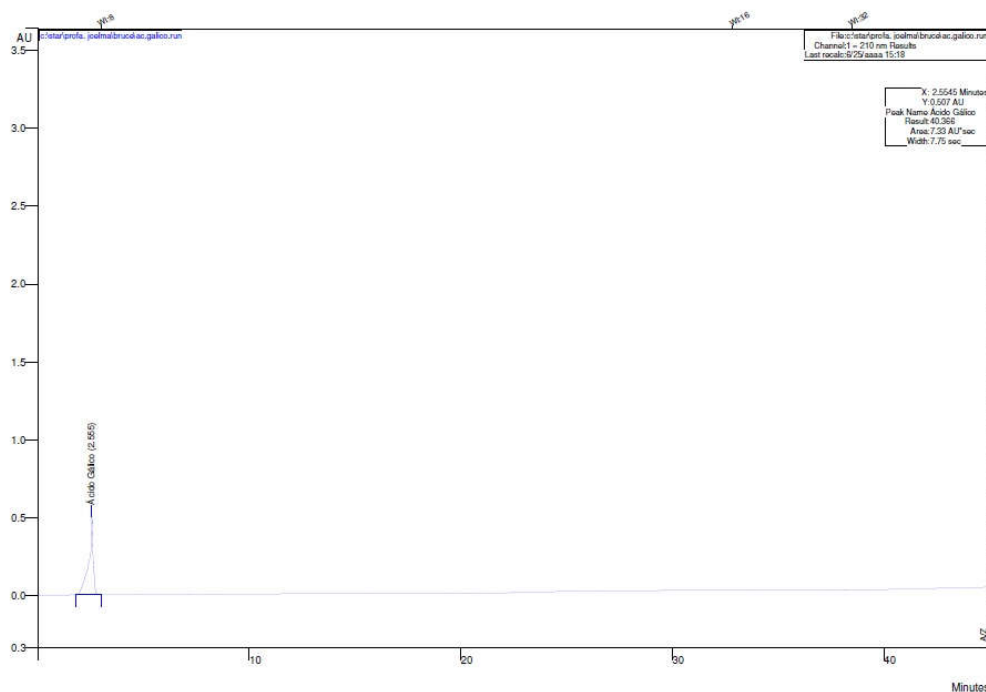
Os cromatogramas sobrepostos dos marcadores químicos de *P. pseudocaryophyllus*, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol, estão reunidos na Figura 18, enquanto a sua identificação no perfil cromatográfico do EPP_m é mostrada na figura 19, juntamente com as estruturas químicas do ácido gálico, catequina, quercitrina e (*E*)-metiliso Eugenol.

Figura 12 - Perfil cromatográfico do extrato seco obtido das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metilisoeugenol (EPP_m).



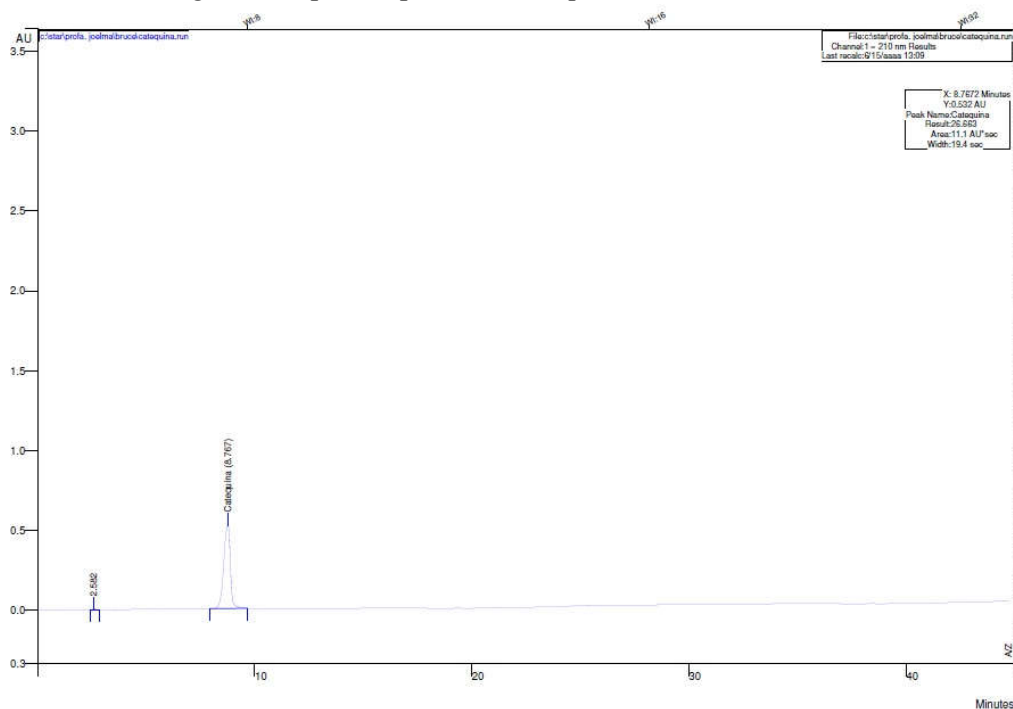
Legenda: Cromatógrafo (Varian Pro Star[®]) equipado com detector UV-Visível (210 nm), injetor automático, fluxo de 1 mL/min; volume de injeção de 10 µL; coluna analítica Supelco[®] C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm); temperatura de 25 °C e eluição da fase móvel por gradiente conforme Sartin (2013).

Figura 13 - Cromatograma do padrão primário ácido gálico.



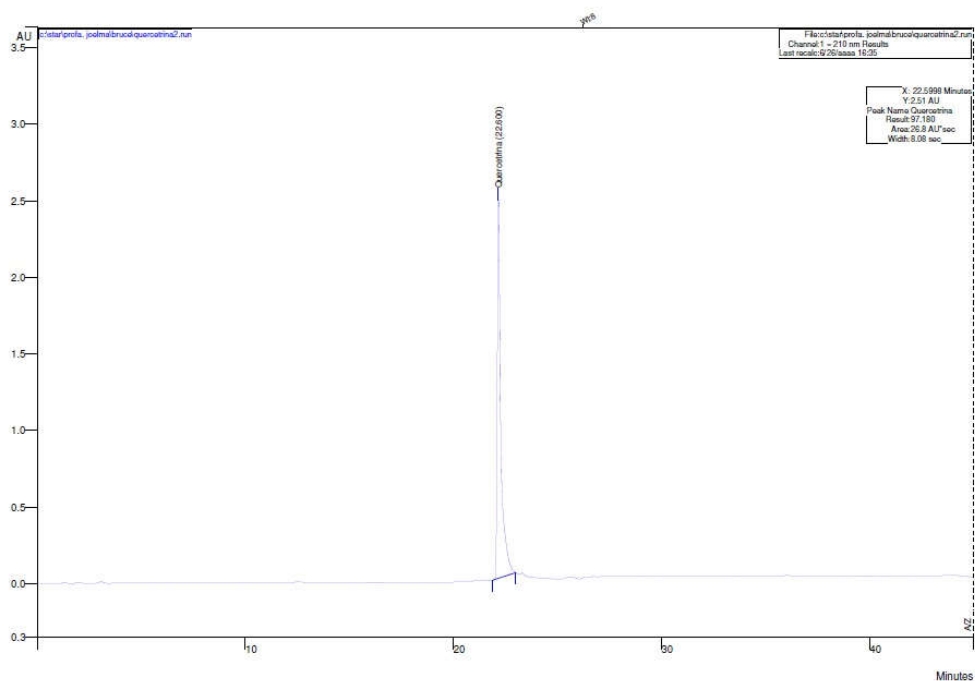
Legenda: Cromatógrafo (Varian Pro Star[®]) equipado com detector UV-Visível (210 nm), injetor automático, fluxo de 1 mL/min; volume de injeção de 10 µL; coluna analítica Supelco[®] C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm); temperatura de 25 °C e eluição da fase móvel por gradiente conforme Sartin (2013).

Figura 14 - Cromatograma do padrão primário catequina.



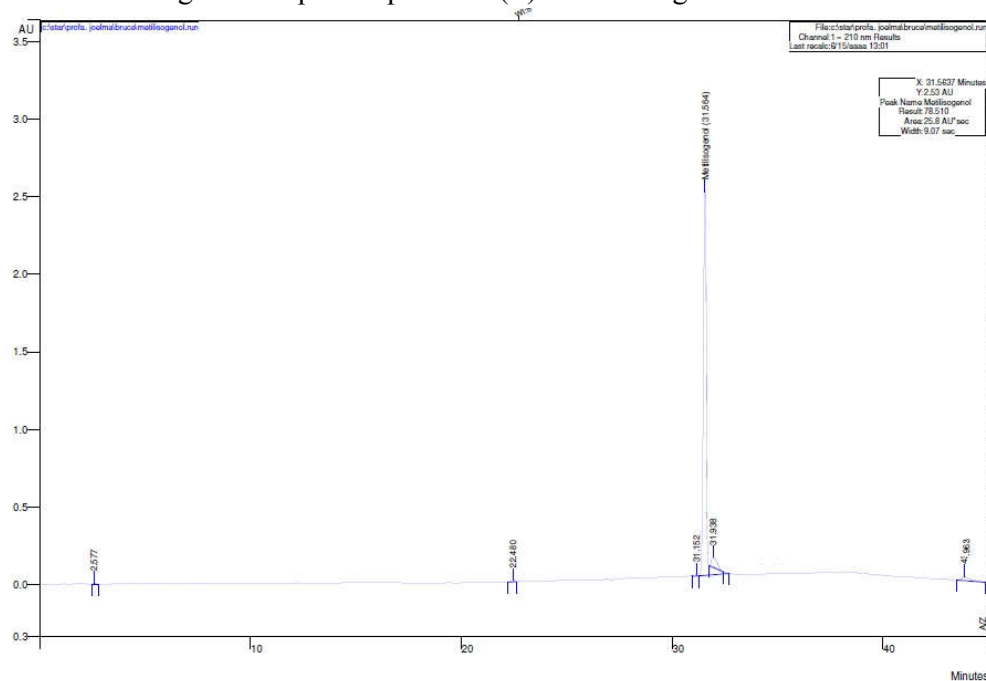
Legenda: Cromatógrafo (Varian Pro Star[®]) equipado com detector UV-Visível (210 nm), injetor automático, fluxo de 1 mL/min; volume de injeção de 10 μ L; coluna analítica Supelco[®] C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm); temperatura de 25 °C e eluição da fase móvel por gradiente conforme Sartin (2013).

Figura 15 - Cromatograma do padrão primário quercitrina.



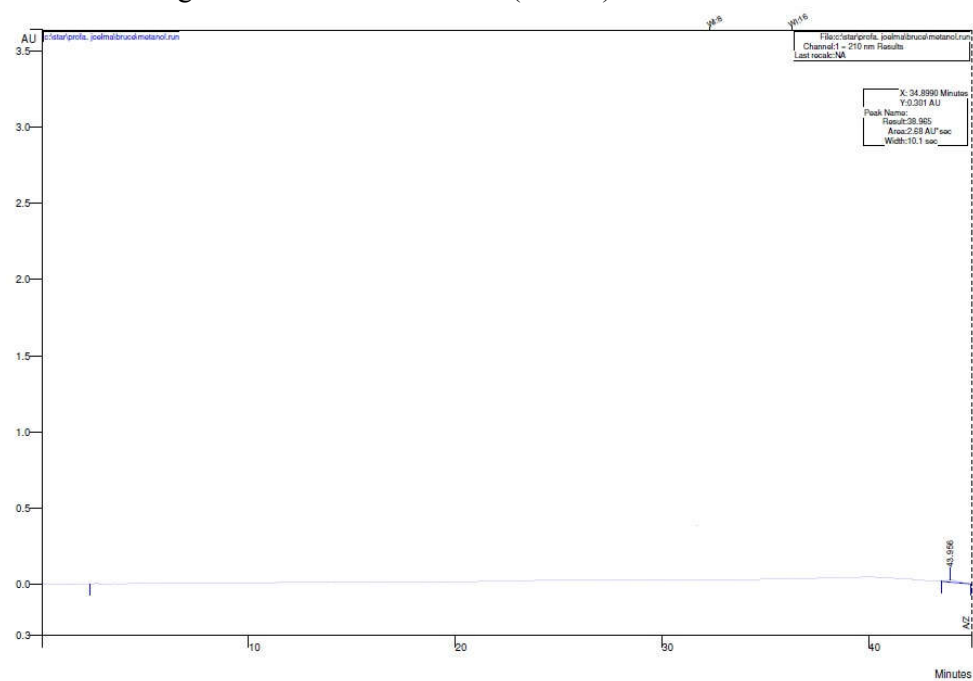
Legenda: Cromatógrafo (Varian Pro Star[®]) equipado com detector UV-Visível (210 nm), injetor automático, fluxo de 1 mL/min; volume de injeção de 10 μ L; coluna analítica Supelco[®] C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm); temperatura de 25 °C e eluição da fase móvel por gradiente conforme Sartin (2013).

Figura 16 - Cromatograma do padrão primário (*E*)-metiliso Eugenol.



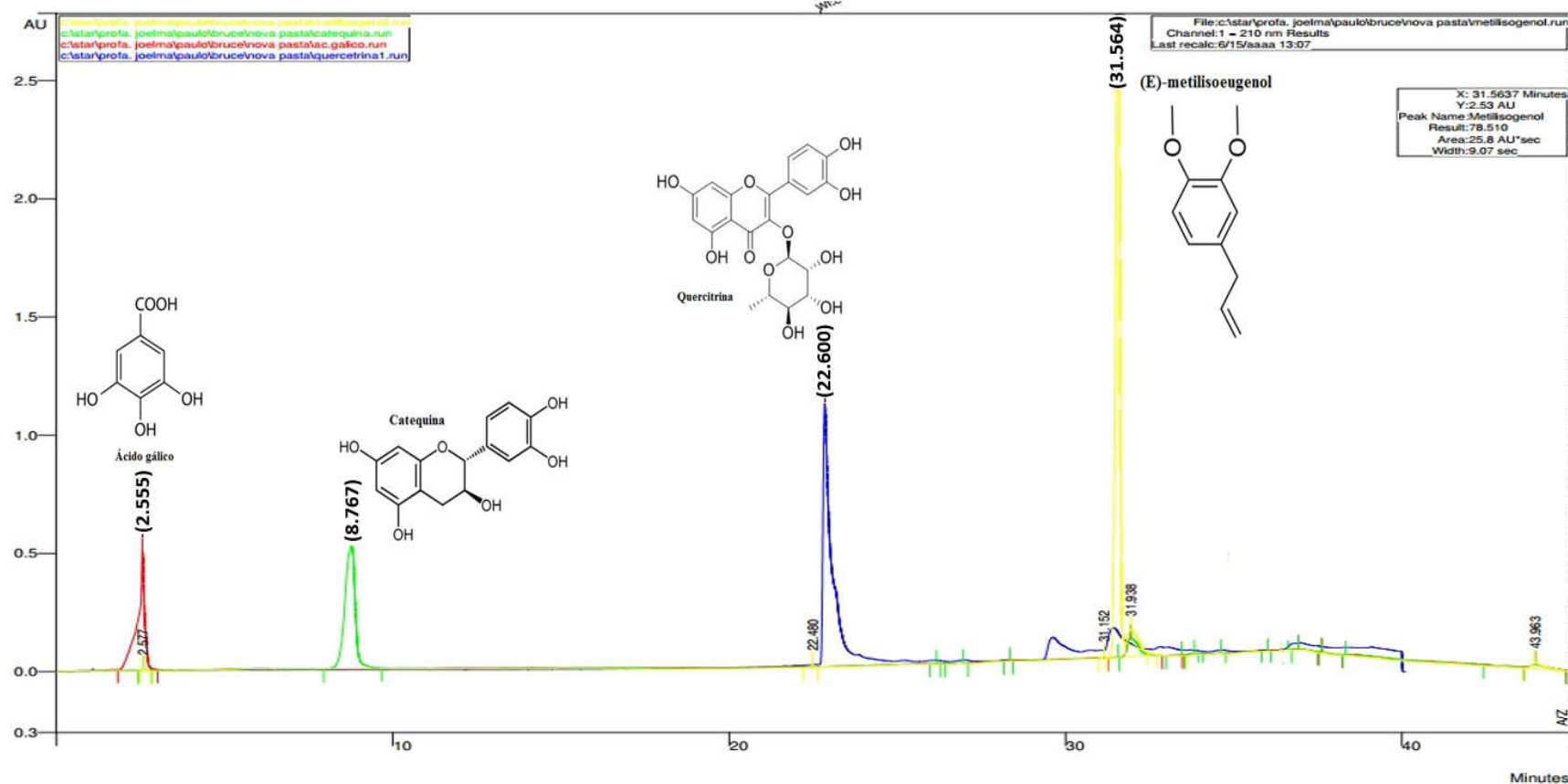
Legenda: Cromatógrafo (Varian Pro Star[®]) equipado com detector UV-Visível (210 nm), injetor automático, fluxo de 1 mL/min; volume de injeção de 10 μ L; coluna analítica Supelco[®] C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm); temperatura de 25 °C e eluição da fase móvel por gradiente conforme Sartin (2013).

Figura 17 - Cromatograma do solvente metanol (branco).



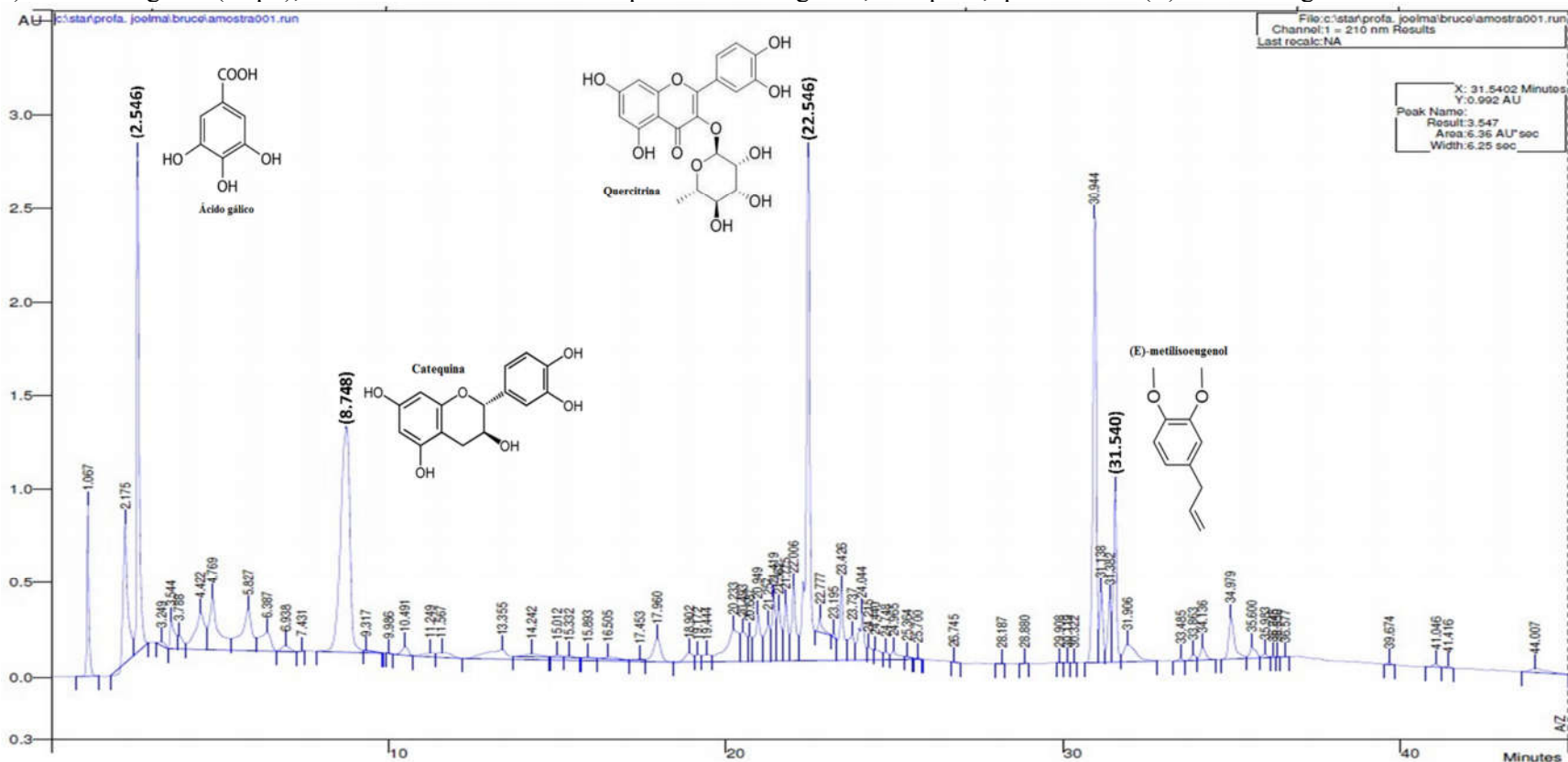
Legenda: Cromatógrafo (Varian Pro Star[®]) equipado com detector UV-Visível (210 nm), injetor automático, fluxo de 1 mL/min; volume de injeção de 10 μ L; coluna analítica Supelco[®] C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm); temperatura de 25 °C e eluição da fase móvel por gradiente conforme Sartin (2013).

Figura 18 - Cromatogramas sobrepostos dos padrões primários ácido gálico, catequina, quercitrina e (*E*)-metilisoeugenol.



Legenda: Cromatógrafo (Varian Pro Star[®]) equipado com detector UV-Visível (210 nm), injetor automático, fluxo de 1 mL/min; volume de injeção de 10 μ L; coluna analítica Supelco[®] C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm); temperatura de 25 $^{\circ}$ C e eluição da fase móvel por gradiente conforme Sartin (2013).

Figura 19 - Perfil cromatográfico do extrato seco obtido das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metilisoeugenol (EP_m), identificados os marcadores químicos ácido gálico, catequina, quercitrina e (*E*)-metilisoeugenol.



Legenda: Cromatógrafo (Varian Pro Star[®]) equipado com detector UV-Visível (210 nm), injetor automático, fluxo de 1 mL/min; volume de injeção de 10 μ L; coluna analítica Supelco[®] C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm); temperatura de 25 $^{\circ}$ C e eluição da fase móvel por gradiente conforme Sartin (2013).

4.2 Toxicidade materna

4.2.1 Sinais clínicos de toxicidade materna

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade materna, tais como mudanças ou alterações na pele ou no pelo, alterações nos olhos (sangramentos), nas membranas mucosas, no sistema circulatório, no sistema respiratório, no sistema nervoso central e autônomo, nos padrões comportamentais e somatomotor, em nenhum dos grupos tratados com EPP_m nas doses de 2.000, 2.500, 3.000 mg/kg, quando comparados ao grupo controle. Ressalta-se, apenas, que as fêmeas tratadas com EPP_m mostraram-se mais agitadas e agressivas, tornando a imobilização dificultada durante o tratamento.

4.2.2 Ganho de massa corporal pelas progenitoras

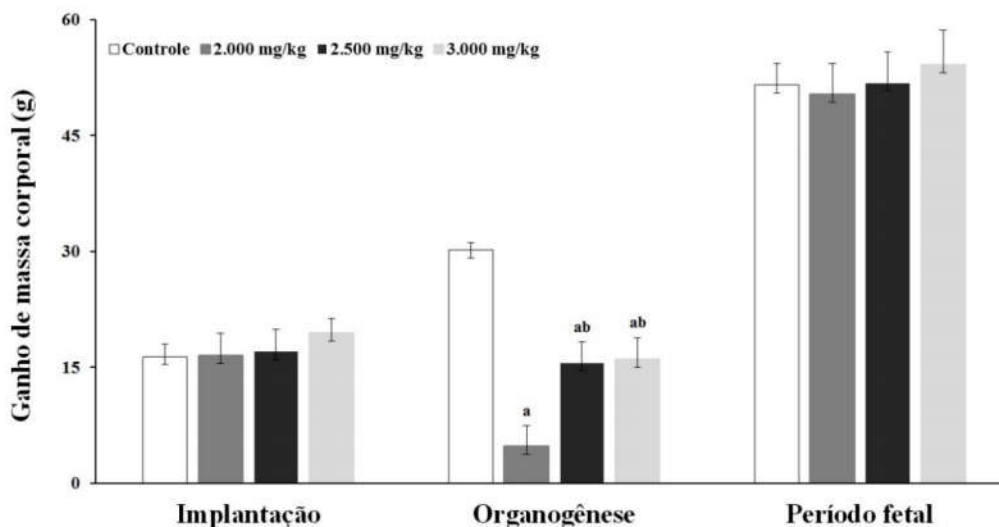
A Anova unifatorial do ganho de massa corporal por período gestacional evidenciou que houve diferença significativa entre os tratamentos apenas durante a organogênese [$F_{(3,38)} = 13,91$; $p \leq 0,001$]. O teste post hoc de Newman-Keuls mostrou redução no ganho de massa corporal nas fêmeas tratadas com as doses de 2.000, 2.500 e 3.000 mg/kg de EPP_m quando comparadas ao grupo controle ($p \leq 0,001$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,01$, respectivamente). Adicionalmente, foi observada redução no ganho de massa corporal nas fêmeas do grupo 2.000 mg/kg em relação aos grupos 2.500 mg/kg ($p \leq 0,05$) e 3.000 mg/kg ($p \leq 0,01$), como mostra a Figura 20.

Em relação ao ganho relativo de massa corporal (%) durante os 21 dias de gestação, a Anova para medidas repetidas mostrou que houve efeito significativo do tratamento [$F_{(3,38)} = 4,94$; $p \leq 0,01$], do dia [$F_{(20,760)} = 613,62$; $p = 0,0001$] e interação tratamento x dia [$F_{(60,760)} = 4,79$; $p \leq 0,001$].

A análise post hoc utilizando o teste F de comparações planejadas revelou redução no ganho relativo de massa corporal no período do DG 9 ao DG 21 nas progenitoras tratadas com 2.000 mg/kg, do DG 11 ao DG 19 para as de 2.500 mg/kg e do DG 12 ao DG 14 para as de 3.000 mg/kg em relação ao grupo controle.

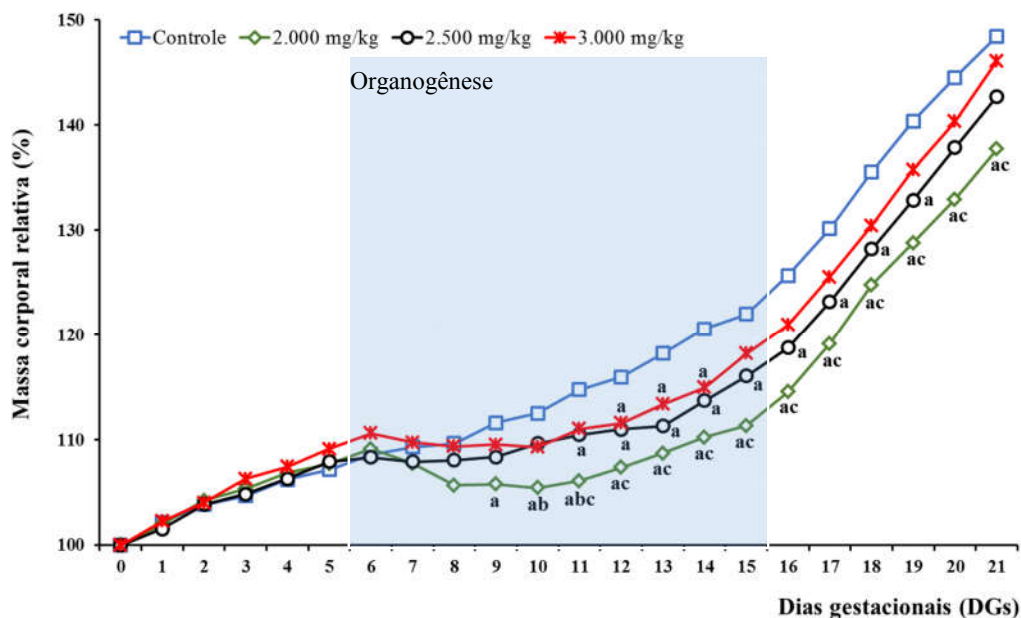
Adicionalmente, a redução no ganho relativo de massa corporal das fêmeas que receberam a dose de 2.000 mg/kg mostrou-se ainda mais pronunciada que a observada nas fêmeas do grupo 2.500 mg/kg nos DGs 10 e 11 e do grupo 3.000 mg/kg entre os DGs 11 a 21 (Figura 21).

Figura 20 - Ganho médio de massa corporal (g) durante os períodos gestacionais das fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m) nas doses de 2.000 (n=11), 2.500 (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da organogênese.



Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Anova unifatorial seguida do teste de Newman-Keuls. **a** $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle; **b** $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 2.000 mg/kg.

Figura 21 - Ganho relativo de massa corporal durante a gestação de fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m) nas doses de 2.000 (n=11), 2.500 (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da organogênese.

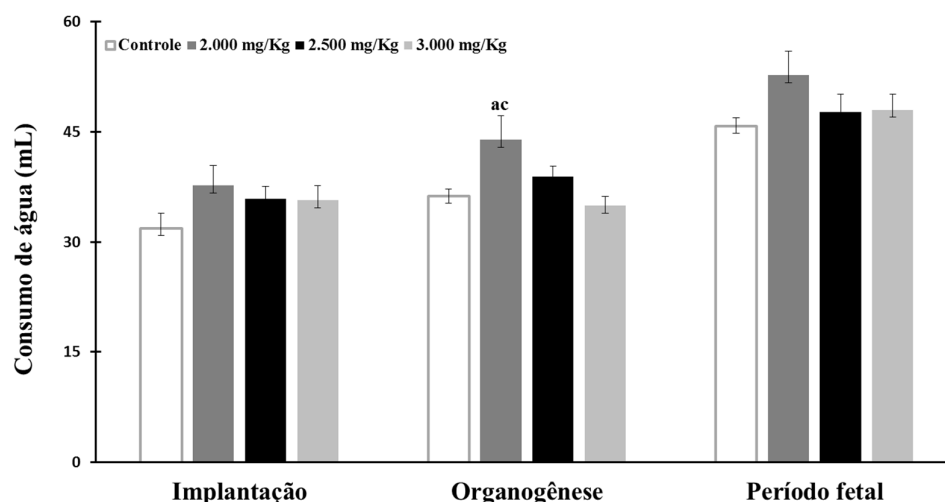


Dados expressos em média. Massa corporal relativa das progenitoras (DG 0 = 100%). Anova para medidas repetidas seguida do teste F de comparações planejadas. **a** $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle; **b** $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 2.500 mg/kg; **c** $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 3.000 mg/kg.

4.2.3 Consumo de água

Quando aplicada ao parâmetro consumo médio de água (mL) durante cada um dos três períodos gestacionais, a Anova unifatorial apontou diferença significativa entre os tratamentos apenas durante a organogênese [$F_{(3,38)} = 3,94$; $p \leq 0,05$]. O teste post hoc de Newman-Keuls mostrou que neste período as fêmeas que receberam EPP_m na dose de 2.000 mg/kg consumiram mais água que as fêmeas dos grupos controle ($p \leq 0,05$) e 3.000 mg/kg ($p \leq 0,05$) (Figura 22).

Figura 22 - Consumo médio de água (mL) durante os períodos gestacionais das fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metilisoeugenol (EPP_m) nas doses de 2.000 (n=11), 2.500 (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da organogênese.

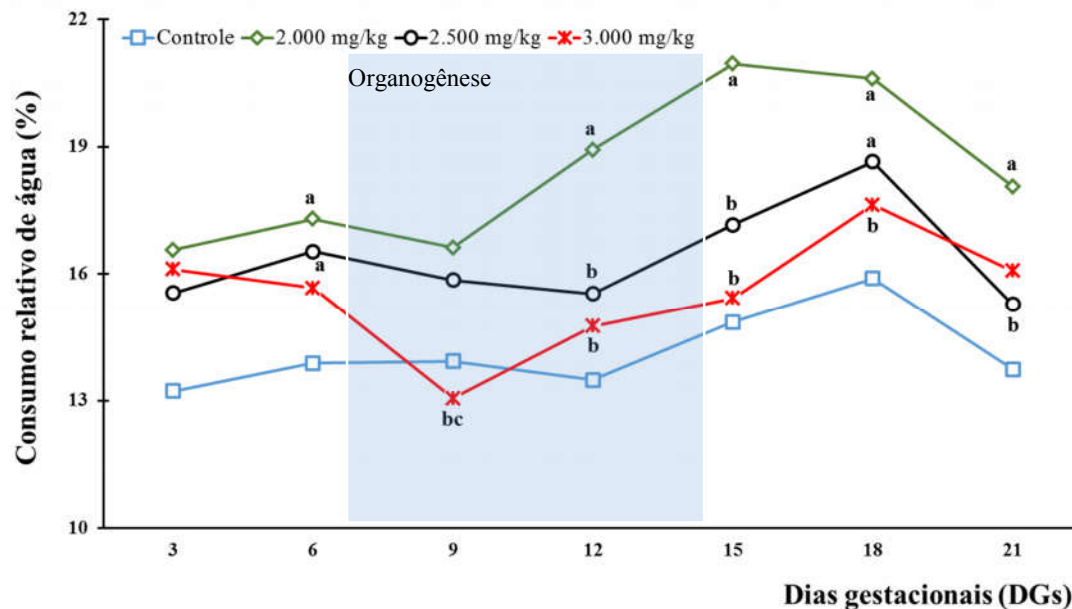


Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Anova unifatorial seguida do teste de Newman-Keuls. **a** $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle; **c** $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 3.000 mg/kg.

Em relação ao consumo relativo de água (%) mensurado a cada três dias, a Anova para medidas repetidas mostrou efeito significativo do tratamento [$F_{(3,38)} = 6,11$; $p \leq 0,01$], do dia [$F_{(6,228)} = 13,27$; $p = 0,0001$] e interação tratamento x dia [$F_{(18,228)} = 2,04$; $p \leq 0,01$]. A análise post hoc utilizando o teste F de comparações planejadas revelou aumento no consumo médio de água pelas fêmeas dos grupos 2.000 mg/kg no DG 6 e no período dos DGs 12 a 21 ($p \leq 0,01$) em relação ao grupo controle. As fêmeas do grupo 2.500 mg/kg também aumentaram o consumo médio de água nos DGs 6 e 18 quando comparadas às fêmeas do grupo controle. Por outro lado, o consumo relativo de água nos grupos 2.500 e 3.000 mg/kg foi inferior ao do grupo 2.000 mg/kg nos DGs 12,15 e 21 e nos DGs 9 a 18, respectivamente ($p \leq 0,05$). Ademais, a

ingestão de água no grupo 3.000 mg/kg foi inferior à registrada no grupo 2.500 mg/kg no DG 9 ($p \leq 0,05$), como mostra a Figura 23.

Figura 23 - Consumo relativo de água (%) durante a gestação de fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metilisoeugenol (EPP_m) nas doses de 2.000 (n=11), 2.500 (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da organogênese.



Consumo relativo de água [(consumo médio de água em relação à média da massa corporal a cada três dias) x 100]. Anova para medidas repetidas seguida do teste F de comparações planejadas.

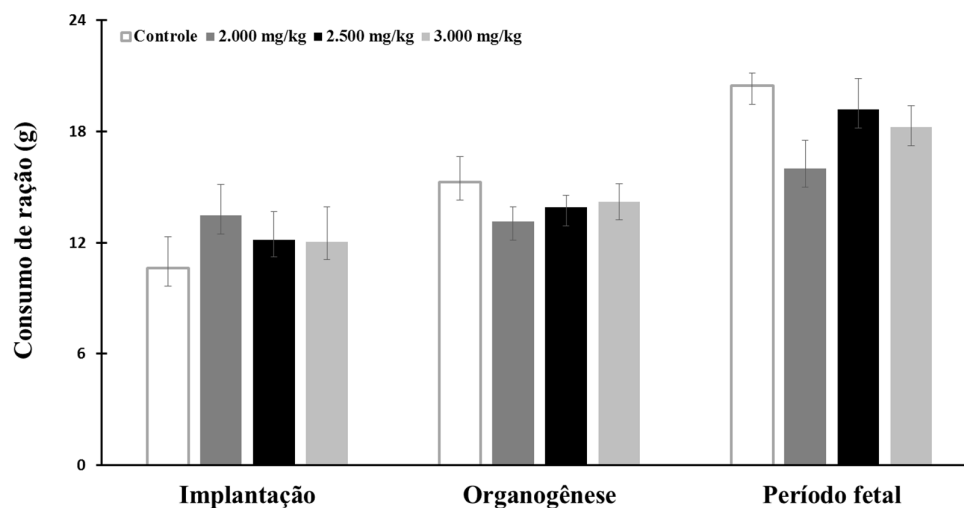
a $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle; **b** $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 2.000 mg/kg; **c** $p \leq 0,05$ em relação ao grupo 2.500 mg/kg.

4.2.4 Consumo de ração

A Anova unifatorial para o parâmetro consumo médio de ração (g) durante cada período gestacional não revelou quaisquer diferenças significativas entre os grupos analisados, seja na implantação [$F_{(3,38)} = 0,61$; $p > 0,05$], na organogênese [$F_{(3,38)} = 0,96$; $p > 0,05$] ou no período fetal [$F_{(3,38)} = 2,06$; $p > 0,05$] (Figura 24).

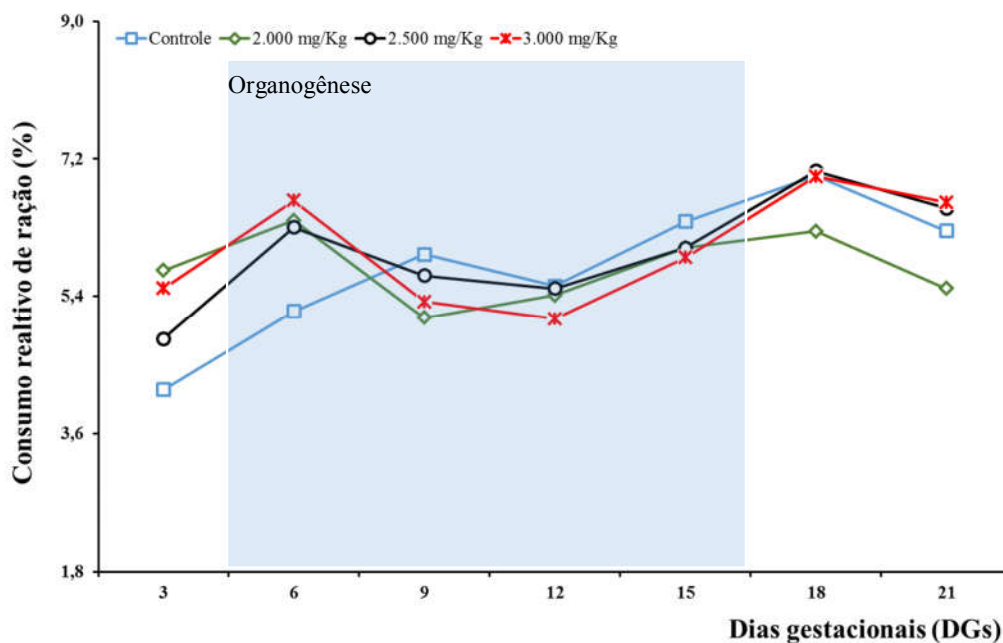
A Anova para medidas repetidas do consumo relativo de ração mensurado a cada três dias (%) mostrou que houve efeito significativo do dia [$F_{(6,18)} = 6,99$; $p < 0,0001$]. Entretanto, não houve efeito do tratamento [$F_{(3,38)} = 0,23$; $p > 0,87$], tampouco interação entre tratamento e dia [$F_{(18,228)} > 1,08$; $p > 0,37$], como mostra a Figura 25.

Figura 24 - Consumo médio de ração (g) durante os períodos gestacionais das fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m) nas doses de 2.000 (n=11), 2.500 (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da organogênese.



Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Anova unifatorial.

Figura 25 - Consumo relativo de ração (%) durante a gestação de fêmeas tratadas com o veículo (n= 10) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m) nas doses de 2.000 mg/kg (n=11), 2.500 mg/kg (n=11) ou 3.000 mg/kg (n=10) no período da organogênese.



Consumo relativo de ração [(consumo médio de ração em relação à média da massa corporal a cada três dias) x 100]. Anova para medidas repetidas seguida do teste F de comparações planejadas.

4.2.5 Desempenho reprodutivo

A Anova unifatorial mostrou que os parâmetros de desempenho reprodutivo das progenitoras tratadas com o extrato seco de *P. pseudocaryophyllus*, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol, nas doses de 2.000, 2.500 e 3.000 mg/kg, não mostraram-se significativamente alterados quando comparados aos parâmetros apresentados pelo grupo controle, como mostram os dados da tabela 9.

A taxa de vitalidade fetal mensurada foi de 100% e observou-se a presença de reabsorções (Figura 26) em todos os grupos, com frequência muito baixas e sem diferença significativa.

Tabela 9 - Parâmetros de desempenho reprodutivo de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EP_{pm}) nas doses de 2.000, 2.500 ou 3.000 mg/kg durante a organogênese

Parâmetros	EP _{pm} (mg/kg)				F _(3,38)
	Controle	2.000	2.500	3.000	
Número de ninhadas	10	11	11	10	-
Fetos vivos (FV)	11,10 ± 0,86	11,91 ± 0,53	12,00 ± 0,77	12,60 ± 0,58	0,74
Fetos mortos (FM)	-	-	-	-	-
Corpos lúteos (CL)	13,30 ± 0,62	13,09 ± 0,56	13,73 ± 0,74	14,10 ± 0,67	0,47
Sítios de implantação (SI)	11,70 ± 0,56	12,27 ± 0,49	13,00 ± 0,80	13,20 ± 0,63	1,15
Reabsorções	0,90 ± 0,50	0,36 ± 0,20	1,00 ± 0,49	0,60 ± 0,31	0,56
Perda pré-implantação %	11,64 ± 2,91	5,99 ± 1,96	5,67 ± 4,99	6,23 ± 2,27	1,66
Perda pós-implantação %	5,83 ± 4,98	0,03 ± 0,02	7,14 ± 3,54	4,26 ± 2,00	1,00
Peso fetal	4,67 ± 0,09	4,32 ± 0,12	4,43 ± 0,15	4,49 ± 0,14	1,26
Peso placentário	0,49 ± 0,03	0,45 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,46 ± 0,02	1,00

Nota: valores expressos em média ± erro padrão da média. Anova unifatorial. Em todas as análises a ninhada foi utilizada como unidade de medida. Perda pré-implantação = (CL-SI/CL*100). Perda pós-implantação = (SI-FV/SI*100).

Abreviatura: Extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EP_{pm}).

Figura 26 – Presença de reabsorções no corno uterino esquerdo de fêmea pertencente ao grupo que recebeu o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m) na dose de 2.500 mg/kg durante a organogênese.



Legenda: Corno uterino esquerdo com seis sítios de implantação (setas pretas) e três reabsorções (setas vermelhas).
Fonte: próprio autor.

4.2.6 Avaliação bioquímica de parâmetros hepáticos e renais

A Tabela 10 mostra os resultados da avaliação bioquímica de marcadores hepáticos e renais das fêmeas tratadas com o veículo ou com o extrato seco de *P. pseudocaryophyllus*, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol durante a organogênese. A Anova unifatorial não apontou diferenças significativas entre os tratamentos em relação às concentrações de creatinina, ureia, TGO, TGP, FA, proteínas totais e albumina.

Tabela 10 - Parâmetros bioquímicos hepáticos e renais de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m) nas doses de 2.000, 2.500 ou 3.000 mg/kg durante a organogênese.

Parâmetros	EPP _m (mg/kg)			F _(3,38)	
	Controle	2.000	2.500		3.000
Creatinina (mg/dL)	0,40 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,38 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,1
Uréia (mg/dL)	41,13 ± 1,57	38,64 ± 2,51	38,73 ± 2,26	40,60 ± 2,31	0,3
TGO (U/L)	100,50 ± 16,69	98,18 ± 13,25	76,30 ± 5,43	78,78 ± 4,41	1,3
TGP (U/L)	51,25 ± 5,06	40,64 ± 3,81	54,18 ± 5,60	49,00 ± 3,42	1,7
Fosfatase alcalina (U/L)	346,86 ± 30,89	317,09 ± 29,19	366,55 ± 40,81	344,11 ± 37,57	0,4
Proteínas totais (g/dL)	5,34 ± 0,31	4,78 ± 0,32	5,08 ± 0,20	5,09 ± 0,16	0,7
Albumina (g/dL)	1,98 ± 0,23	2,25 ± 0,10	2,28 ± 0,09	2,04 ± 0,12	1,3

Nota: valores expressos em média ± erro-padrão da média. Anova unifatorial. Abreviaturas: Extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m), Transaminase Glutâmica Oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmica Pirúvica (TGP).

4.3 Toxicidade do desenvolvimento

4.3.1 Análise fetal externa

Não foram observadas quaisquer variações ou malformações externas nos fetos nos grupos tratados com EPP_m, tampouco no grupo controle (Tabela 11).

Tabela 11 - Ocorrência de anormalidade na morfologia externa de fetos de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliseugenol (EPP_m) nas doses de 2.000, 2.500 ou 3.000 mg/kg durante a organogênese.

Parâmetros	Controle	EPP _m (mg/kg)		
		2.000	2.500	3.000
Ninhadas analisadas	10	11	11	10
Fetos analisados	111	131	132	126
Fetos com variações externas	0	1 (0,76)*	1 (0,76)*	1 (0,79)*
Fetos com malformações externas	0	0	0	0

Nota: valores expressos em números absolutos. Os valores entre parênteses indicam a porcentagem relativa de fetos afetados [total de fetos afetados/número total de fetos analisados por grupo x 100]. Teste do Qui quadrado de Pearson. * Tamanho \leq 45 mm; Peso \leq 3 g.

Abreviatura: Extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, quimiotipo (*E*)-metiliseugenol (EPP_m).

Apenas um feto em cada grupo tratado com EPP_m apresentou variação no tamanho (\leq 30 mm), conforme mostra a Figura 27.

Figura 27 - Variação no tamanho de fetos provenientes de fêmea tratada com a dose de 2.000 mg/kg de extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliseugenol (EPP_m) no período da organogênese.



Fonte: próprio autor

4.3.2 Análise esquelética fetal

Para avaliar o efeito do EPP_m sobre o desenvolvimento ósseo da prole de ratas Wistar, 500 fetos tiveram seus esqueletos completos analisados quanto à presença de variações ou malformações.

4.3.2.1 Observações no esqueleto axial

O tratamento com o EPP_m nas doses de 2.000, 2.500 e 3.000 mg/kg não alterou a frequência de variações esqueléticas cranianas em comparação com os fetos do grupo controle ($p \geq 0,05$, teste do qui-quadrado). Na análise do crânio foram observados casos isolados de atrasos na ossificação dos ossos parietais, interparietal, supraoccipital, zigomático, exoccipital e palato, como mostra a Tabela 12.

Tabela 12 - Ocorrência de variações esqueléticas nos ossos cranianos das ninhadas de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m) nas doses de 2.000, 2.500 ou 3.000 mg/kg durante a organogênese.

Parâmetros	Controle	EPP _m (mg/kg)		
		2.000	2.500	3.000
Ninhadas analisadas	10	11	11	10
Fetos analisados	111	131	132	126
Crânio				
<i>Parietal</i>				
Ossificação incompleta	3 (2,70)	0	1 (0,76)	0
<i>Interparietal</i>				
Ossificação incompleta	0	0	1 (0,76)	0
<i>Supraoccipital</i>				
Ossificação incompleta	0	0	1 (0,76)	0
<i>Zigomático</i>				
Ossificação incompleta	0	0	1 (0,76)	0
<i>Exoccipital</i>				
Ossificação incompleta	0	0	1 (0,76)	0
<i>Palato</i>				
Ossificação incompleta	1 (0,90)	0	1 (0,76)	0

Nota: valores expressos em números absolutos. Os valores entre parênteses indicam a porcentagem relativa de fetos afetados [total de fetos afetados/número total de fetos analisados por grupo x 100]. Teste do Qui-quadrado de Pearson.

Abreviatura: Extrato seco obtido das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m).

Na análise dos demais ossos do esqueleto axial foram observadas alterações nas vértebras cervicais, no esterno e nas costelas (Tabela 13).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação à frequência de costelas supranumerárias/extras e para costelas curtas. Todavia, foram significativas as ocorrências de costelas rudimentares/brotos [$\chi^2 = 17,40$; $df = 3$; $p \leq 0,001$, esterno bipartido [$\chi^2 = 46,74$; $df = 3$; $p = 0,0001$] e esterno com ossificação incompleta [$\chi^2 = 54,32$; $df = 3$; $p = 0,0001$] (Figura 28).

Tabela 13 - Ocorrência de variações e malformações no esqueleto axial das ninhadas de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m) nas doses de 2.000, 2.500 ou 3.000 mg/kg durante a organogênese.

Parâmetros	EPP _m (mg/kg)			
	Controle	2.000	2.500	3.000
Ninhadas analisadas	10	11	11	10
Fetos analisados	111	131	132	126
Vértebras				
<i>Cervicais</i>				
Anomalia congênita*	0	0	6 (4,54)	0
Esterno				
Ossificação incompleta	2 (1,80)	44 (33,59) ^{a,d}	32 (24,24) ^{a,d}	10 (7,94)
Bipartido	0	23 (17,56) ^{a,c,d}	5 (3,79)	1 (0,79)
Costelas				
Rudimentares/brotos	13 (11,71)	20 (15,27)	33 (25,00) ^d	9 (7,14)
Supranumerárias/extras	0	0	5 (3,79)	3 (2,38)
Curtas	0	1 (0,76)	4 (3,03)	0

Nota: valores expressos em números absolutos. Os valores entre parênteses indicam a porcentagem relativa de fetos afetados [total de fetos afetados/número total de fetos analisados por grupo x 100]. Teste do Qui-quadrado de Pearson ajustado pela correção de Bonferroni ($p \leq 0,0084$).

a diferença em relação ao grupo controle; **b** diferença em relação ao grupo 2.000 mg/kg; **c** diferença em relação ao grupo 2.500 mg/kg e **d** diferença em relação ao grupo 3.000 mg/kg.

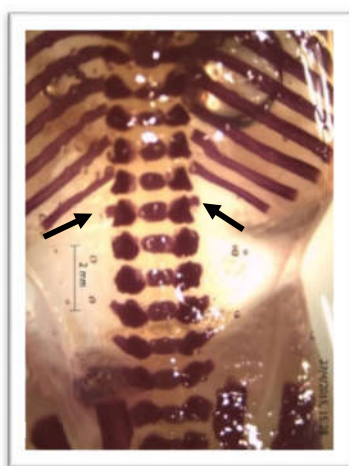
* Coluna cervical curva, com vértebras centrais ausentes e presença de sete pares de costelas rudimentares. Abreviatura: Extrato seco obtido das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EPP_m).

Nas comparações múltiplas intergrupos aplicando o teste do qui-quadrado de Pearson ajustado pela correção de Bonferroni ($p \leq 0,0084$), foi verificado um aumento na frequência de ossificação incompleta do esterno nos grupos 2.000 e 2.500 mg/kg quando comparados aos grupos controle e 3.000 mg/kg (Figura 29). Por sua vez, o esterno bipartido foi mais frequente no grupo 2.000 mg/kg em relação ao grupo controle e aos demais grupos tratados com EPP_m.

Quanto às costelas rudimentares ou brotos, os fetos do grupo 2.500 mg/kg apresentaram maior ocorrência dessa variação quando comparados aos do grupo 3.000 mg/kg.

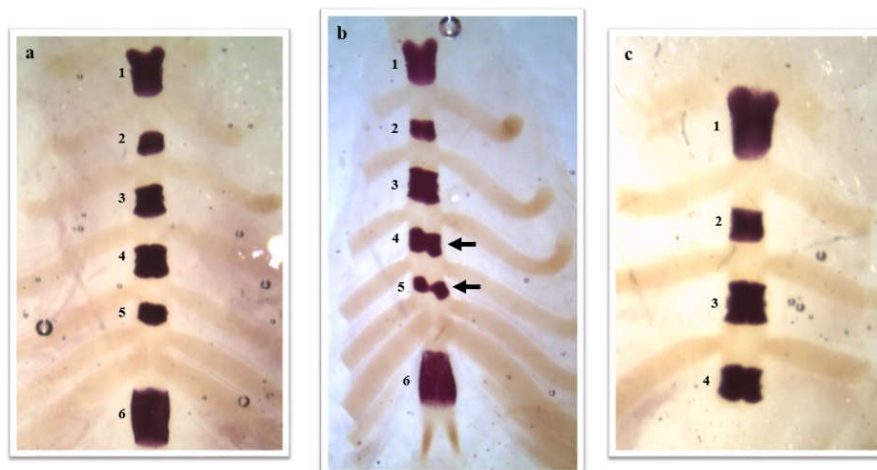
Por fim, a única malformação observada neste estudo foi a presença de coluna cervical curva com vértebras centrais ausentes e presença de sete pares de costelas rudimentares em seis fetos de uma mesma ninhada do grupo 2.500 mg/kg (Figura 30). Todavia, esses achados não foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 28 - Brotos ou costelas rudimentares na primeira vértebra lombar de feto de rata Wistar tratada com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*, (Gomes) Landrum, quimiotipo (*E*)-metilisoegenol, na dose de 2.000 mg/kg no período da organogênese.



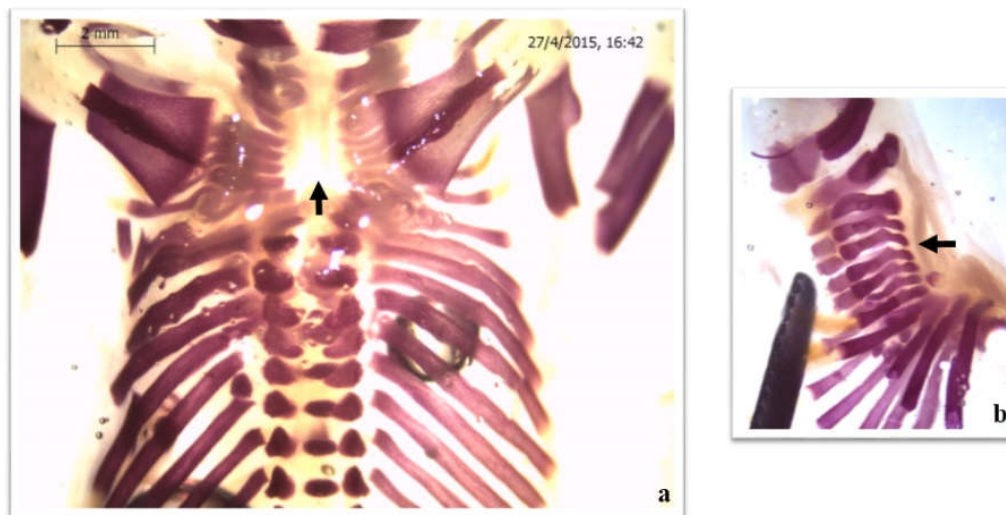
Fonte: próprio autor. Escala: 2 mm.

Figura 29 - Comparação do padrão de ossificação do esterno de fetos de ratas Wistar tratadas com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metilisoegenol, no período da organogênese.



Legenda: **a** Ossificação completa do esterno (Grupo 2.000 m/kg); **b** Ossificação completa do esterno com presença de ossificação bipartida nos sítios 4 e 5 (Grupo 2.000 m/kg); **c** Ossificação incompleta do esterno com apenas 4 sítios (Grupo 2.500 m/kg). Escala: 2 mm. Fonte: próprio autor.

Figura 30 – Malformação esquelética fetal na coluna cervical de seis fetos de fêmea tratada com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metilisoeugenol na dose de 2.500 mg/kg e durante o período da organogênese.



Legenda: **a** Coluna cervical curva e com vértebras centrais ausentes; **b** presença de costelas cervicais. Escala: 2 mm. Fonte: próprio autor.

4.3.2.2 Observações no esqueleto apendicular

Na análise dos ossos que compõem o esqueleto apendicular dos fetos foi verificada diferença significativa na frequência das seguintes variações: metacarpos com ossificação completa [$\chi^2 = 15,81$; $p \leq 0,01$], falanges anteriores com ossificação completa [$\chi^2 = 14,67$; $p \leq 0,01$], falanges anteriores com até 7 sítios de ossificação [$\chi^2 = 14,55$; $p \leq 0,01$], metatarsos com ossificação completa [$\chi^2 = 28,57$; $p \leq 0,001$] e metatarsos com até 9 sítios de ossificação [$\chi^2 = 31,11$; $p \leq 0,0001$]. Para esses casos nos quais variações significativas foram observadas, comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas utilizando o teste do qui-quadrado ajustado pela correção de Bonferroni ($p \leq 0,0084$). Os resultados da análise revelaram que a ocorrência de metacarpos com ossificação completa foi menos frequente no grupo 2.500 mg/kg em relação aos grupos controle e 2.000 mg/kg. Além disso, a ocorrência de falanges anteriores com ossificação completa foi menos frequente nos fetos do grupo 2.500 mg/kg quando comparados aos fetos dos grupos controle e 3.000 mg/kg. Como consequência, houve aumento na frequência de ossificação incompleta de falanges anteriores (até 7 sítios de ossificação) nos fetos do grupo 2.500 mg/kg quando comparado aos grupos controle e 3.000 mg/kg (Tabela 14).

Tabela 14 – Ocorrência de alterações no esqueleto apendicular das ninhadas de ratas Wistar tratadas com o veículo (controle) ou com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EP_m) nas doses de 2.000, 2.500 e 3.000 mg/kg durante a organogênese.

Parâmetros	EP _m (mg/kg)			
	Controle	2.000	2.500	3.000
Ninhadas analisadas	10	11	11	10
Fetos analisados	111	131	132	126
Metacarpos				
8 sítios de ossificação	111 (100)	129 (98,47)	120 (90,91) ^{a,b}	120 (95,24)
≤ 7 sítios de ossificação	0	2 (1,53)	8 (6,06)	3 (2,38)
Ausentes	0	0	4 (3,03)	3 (2,38)
Falanges anteriores				
8 sítios de ossificação	76 (68,47)	81 (61, 83)	62 (46,97) ^{a,d}	83 (65,87)
≤ 7 sítios de ossificação	35 (31,53)	48 (36,64)	65 (49,24) ^{a,d}	35 (27,78)
Ausentes	0	2 (1,53)	5 (3,79)	8 (6,35)
Metatarsos				
10 sítios de ossificação	71 (63, 97)	56 (42,75) ^{a,d}	47 (35,61) ^{a,d}	77 (61,12)
≤ 9 sítios de ossificação	37 (33,33)	75 (57,25) ^{a,d}	81 (61,36) ^{a,d}	45 (35,71)
Ausentes	3 (2,70)	0	4 (3,03)	4 (3,17)
Falanges posteriores				
8 sítios de ossificação	9 (8,11)	3 (2,29)	2 (1,51)	10 (7,94)
≤ 7 sítios de ossificação	34 (30,63)	31 (23,66)	34 (25,76)	35 (27,78)
Ausentes	68 (61,26)	97 (74,05)	96 (72,73)	81 (64,28)

Nota: valores expressos em números absolutos. Os valores entre parênteses indicam a porcentagem relativa de fetos afetados [total de fetos afetados/número total de fetos analisados por grupo x 100].

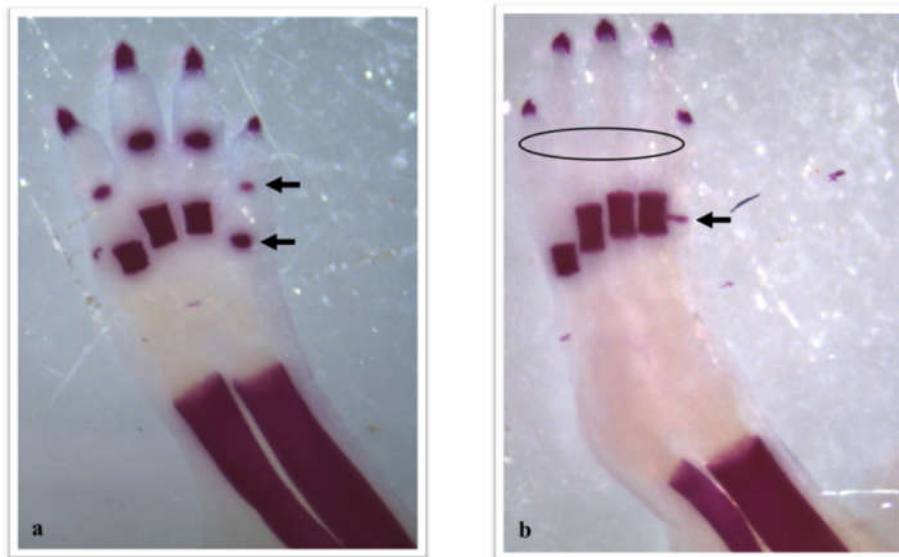
Teste do Qui-quadrado de Pearson ajustado pela correção de Bonferroni ($p \leq 0,0084$).

a diferença em relação ao grupo controle; **b** diferença em relação ao grupo 2.000 mg/kg; **c** diferença em relação ao grupo 2.500 mg/kg; **d** diferença em relação ao grupo 3.000 mg/kg.

Abreviatura: Extrato seco obtido das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EP_m).

Adicionalmente, a ocorrência de metatarsos com ossificação completa foi menos frequente nos grupos 2.000 e 2.500 mg/kg quando comparados aos grupos controle e 3.000 mg/kg. Não foram observadas variações significativas na frequência de ocorrência de metacarpos com ossificação incompleta ou ausente, falanges anteriores ausentes, metatarsos ausentes e falanges posteriores com ossificação completa, incompleta ou ausente (Figura 31).

Figura 31 – Variações esqueléticas fetais em metacarpos, metatarsos e falanges anteriores e posteriores de fetos de ratas Wistar tratadas com o extrato seco das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae), quimiotipo (*E*)-metilisoeugenol na dose de 2.000 mg/kg e durante o período da organogênese.



Legenda: **a** Ossificação completa de metacarpos e falanges anteriores; **b** Ossificação completa de metatarsos e ausência de sítios de ossificação de falanges posteriores. Escala: 2 mm. Fonte: próprio autor.

5 DISCUSSÃO

Tradicionalmente, a *P. pseudocaryophyllus* tem sido usada pela população brasileira com as mais diversas finalidades terapêuticas, como digestivo, ansiolítico e regulador menstrual. Contudo, seu perfil de segurança segue desconhecido, tendo em vista a ausência de relatos na literatura voltados à descrição de seus aspectos toxicológicos pré-clínicos. Tal carência de informações toxicológicas também é observada em outros membros do gênero *Pimenta*, como *P. dioica* e *P. racemosa*, cujos poucos estudos disponíveis indicam que os extratos aquosos obtidos das folhas dessas duas espécies mostraram-se não tóxicos quando testados em camundongos machos adultos (PAULA et al., 2010). Uma semelhança quimiotaxonômica que merece destaque é o fato de a *P. dioica* e *P. racemosa* possuírem potenciais propriedades farmacológicas semelhantes às demonstradas pela *P. pseudocaryophyllus*, como as atividades inseticida (SEO et al., 2009; MARTINEZ-VELAZQUEZ et al., 2011; KIM et al., 2012), anti-inflamatória/antinociceptiva (GARCIA et al., 2004), antimicrobiana (SAENZ et al., 2004), antioxidante (KIKUZAKI et al., 1999) e depressora do sistema nervoso central (SUÁREZ; ULATE; CICCIO, 1997).

5.1 Preparo e análise do extrato seco

Os rendimentos alcançados nas extrações de óleos essenciais obtidos das folhas de *P. pseudocaryophyllus* por hidrodestilação variam de 0,3% a 2,64% (PAULA et al., 2011; GIRARD, 2005). Por outro lado, não foram encontradas informações acerca do rendimento obtido na produção do extrato seco por nebulização (*Spray drying*). Ainda assim, a escolha pelo encadeamento das técnicas de percolação, rotaevaporação e secagem por nebulização na preparação do extrato seco obtido das folhas de *P. pseudocaryophyllus*, quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol (EP_m), mostrou-se adequada por permitir a obtenção de rendimento satisfatório de 12,49%. Todavia, adotando a técnica de rotaevaporação para obter o EP_m, Paula (2011) alcançou um rendimento de 28,45% p/p de extrato seco, partindo de uma amostra de 200 g das folhas de *P. pseudocaryophyllus* pulverizadas. Esse melhor rendimento deveu-se, possivelmente, às características do processo de rotaevaporação, em que o solvente volatilizado não carrega consigo partículas sólidas do extrato em suspensão, como ocorre na secagem por aspersão.

De fato, a secagem de extratos de plantas pode ser obtida pelas técnicas de nebulização (*spray drying*), rotaevaporação, liofilização e leito de jorro. Por tratar-se de

material que contém princípios ativos, é fundamental que o processo escolhido preserve a composição química do fitocomplexo presente no extrato e gere um granulado homogêneo, estável, concentrado e asséptico, com granulometria, umidade, densidade e forma adequadas à finalidade pretendida. No caso da indústria farmacêutica, a produção de extratos secos a partir de extratos líquidos brutos de plantas medicinais tem por finalidade obter granulados padronizados para compor formas farmacêuticas de medicamentos fitoterápicos. Sendo assim, é fundamental que o processo de secagem escolhido, além de garantir padronização, ainda seja adequado à escala industrial e, claro, economicamente viável (SILVA et al., 2012).

Dessa forma, ainda que seja possível obter melhores rendimentos pela técnica de rotaevaporação, conforme demonstrado por Paula et al. (2012), tal processo de secagem se restringe a pequenos volumes, ou seja, não se adequa à produção em larga escala. Por outro lado, a secagem por nebulização permite que toneladas de extrato líquido bruto sejam secados, gerando um granulado de elevada qualidade, com estabilidade físico-química e microbiológica, onde estão preservados os constituintes termossensíveis (CABRAL; SAID; OLIVEIRA, 2009; OLIVEIRA; PETROVICK, 2009). Adicionalmente, a secagem por nebulização ainda permite, mediante ajustes nas condições de secagem, controlar algumas características do produto secado como compressibilidade, atividade de água, tamanho e forma da partícula, higroscopicidade, densidade e escoabilidade. Por tudo isso, a secagem por nebulização mostra-se como um recurso tecnológico de ponta para produção de extratos secos para indústria farmacêutica, pois sua flexibilidade propicia e facilita o desenvolvimento de técnicas de otimização da produção de extratos padronizados, permitindo o uso, inclusive, de adjuvantes inertes para melhorar o rendimento (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; SILVA 2012).

Na avaliação dos aspectos qualitativos do processo de secagem por nebulização adotado neste trabalho, a análise por CLAE mostrou que a técnica adotada foi capaz de preservar a diversidade química do fitocomplexo no extrato seco de *P. pseudocaryophyllus*, apesar das altas temperaturas adotadas. Isso porque a análise cromatográfica identificou a presença de componentes voláteis no extrato seco, como (*E*)-metilisoeugenol, corroborando os achados de Paula et al. (2012). De maneira semelhante, Sartin (2013) também mostrou que a secagem por nebulização é capaz de preservar os constituintes do EP_{pm} em padrões semelhantes aqueles observáveis no extrato etanólico bruto.

Em conjunto, os resultados deste estudo somados aos de Paula et al. (2012) e Sartin et al. (2011) reforçam a ideia de que as substâncias ácido gálico, catequina, quercitrina e (*E*)-metilisoeugenol identificadas no extrato seco de *P. pseudocaryophyllus* possam ser utilizadas

como marcadores químicos do quimiotipo (*E*)-metiliso Eugenol em futuros estudos de padronização e otimização dos extratos secos obtidos a partir desse polimorfo.

Sendo assim, os resultados obtidos com o emprego da técnica de secagem por nebulização de extratos de plantas medicinais mostraram-se condizentes com a literatura, que aponta como principais qualidades do processo o bom rendimento e a capacidade de preservar a diversidade química fitocomplexo, inclusive de seus constituintes mais termossensíveis e, até mesmo, os voláteis, como (*E*)-metiliso Eugenol.

5.2 Toxicidade reprodutiva

5.2.1 Toxicidade materna

Quando analisados os aspectos relacionados à função materna, os resultados mostraram que a administração de EP_m não resultou em quaisquer alterações toxicológicas clínicas observáveis nas progenitoras. Todavia, as fêmeas tratadas com o extrato mostraram-se visivelmente mais agitadas quando comparadas aos animais do grupo controle. Ademais, durante o tratamento com o EP_m as progenitoras apresentaram redução no ganho de massa corporal, que por sua vez, não foi acompanhado de alteração no consumo de ração no mesmo período. Sendo assim, a redução no ganho de massa corporal caracteriza-se por um sinal de toxicidade materna ao tratamento. Por outro lado, o consumo de água aumentou entre as fêmeas dos grupos 2.000 e 2.500 mg/kg/dia, antes e depois do início do tratamento com EP_m, o que relativiza a importância desse achado enquanto um indicativo de toxicidade.

A toxicidade materna caracteriza-se pela ocorrência de significativa redução no peso corporal, presença de sinais clínicos de toxicidade, observação de atividade farmacológica, ocorrência de óbito (KHERA, 1984), redução no consumo de ração e água (ROGERS et al., 2005; CAMPBELL et al., 2009), alterações viscerais e nos parâmetros reprodutivos (HONG et al., 2014), bem como pela ocorrência de variações hematológicas na espécie examinada (EZEJA; ANAGA; ASUZU, 2014). Em estudos de toxicidade reprodutiva, a toxicidade materna deve estar presente em algum grau, contudo, os efeitos tóxicos induzidos pela(s) substância(s)-teste nas progenitoras não devem comprometer excessivamente seu bem estar geral ou submetê-las a sofrimento severo, o que estaria em desacordo com normas internacionais para estudos pré-clínicos e poderia confundir os resultados teratológicos do(s) xenobiótico(s) investigado(s) (OECD, 1995). Sendo assim, em análises toxicológicas reprodutivas, a variável toxicidade materna deve estar presente em algum grau, desde que não seja exacerbado. Todavia, não há consenso sobre qual limiar de toxicidade materna é tolerável

(BEYER et al., 2011). Tal paradoxo, que tem desafiado toxicologistas há tempos, precisa ser considerado na análise dos resultados obtidos em toxicologia reprodutiva, à medida que a toxicidade materna pode ser a promotora de ocorrências de alterações no desenvolvimento fetal, o que torna difícil esclarecer o papel dos xenobióticos sob investigação (CHERNOFF, 2008). Nesse contexto, o correto discernimento entre os impactos toxicológicos provocados diretamente pelos xenobióticos testados e aqueles induzidos de forma indireta sobre a prole é de fundamental importância na interpretação dos resultados em testes de segurança realizados em animais e em sua posterior extrapolação para seres humanos (ALBUQUERQUE et al., 2013). Todavia, estabelecer relações precisas de causalidade entre toxicidade materna e alterações no desenvolvimento embrionário é uma árdua tarefa, especialmente quando há poucos dados sobre a toxicidade do xenobiótico-teste (BEYER et al., 2011), como é o caso do EPP_m.

Na avaliação de desempenho reprodutivo, o tratamento com EPP_m não promoveu alteração nos parâmetros avaliados, como indica a taxa de vitalidade de 100% e a ausência de alterações significativas entre os grupos nos índices de perda pré e pós-implantação e nos pesos fetal e placentário. Sendo assim, a redução no peso materno ocorrida durante a organogênese não foi capaz de induzir alterações significativas no peso fetal. Nesse sentido, Chernoff et al. (2008) chamam atenção para o fato de os efeitos na redução do ganho de massa materno sobre o peso fetal estarem diretamente relacionados ao período gestacional tardio, de modo que a perda perceptível durante a organogênese teria menor impacto sobre o peso fetal que a perda ocorrida no último período da gestação (após DG 15). Indo ao encontro de tal premissa, Beyer et al. (2011), ao analisarem 55 estudos nos quais foram verificadas reduções no ganho de massa corporal das progenitoras durante a organogênese, observaram redução no peso fetal em apenas 16% deles. Em contrapartida, 83% dos estudos que verificaram a redução no ganho de massa das progenitoras durante o período fetal, também notaram redução no peso da prole. Dessa forma, as alterações no peso materno anteriores ao dia gestacional 15 parecem não possuir impacto significativo sobre o peso fetal, como observado no presente estudo.

Ainda sob essa perspectiva, Rogers et al. (2005) ressaltaram que alterações fisiológicas nas progenitoras decorrentes da interação de fatores genéticos, nutricionais, patológicos e, especialmente, daqueles relativos à exposição a xenobióticos e ao estresse podem ser a causa de diversos efeitos adversos observados no desenvolvimento embrio-fetal. Até mesmo em humanos, o estresse materno possui um claro potencial teratogênico que pode induzir o surgimento de malformações congênitas (HANSEN; OLSEN, 2000).

No que se refere à circulação materno-fetal, embora não tenham sido realizadas análises histológicas da placenta, o tratamento com EPP_m parece não ter provocado, aparentemente, alterações morfológicas e fisiológicas no tecido placentário, uma vez que as placentas não variaram, significativamente, de peso entre os grupos testados, tampouco foram observadas alterações nos índices reprodutivos. Todavia, é razoável supor que ao menos os constituintes ou metabólitos lipossolúveis do EPP_m tenham atravessado a placenta e atingido a circulação fetal. Isso porque a placenta possui as propriedades de uma membrana lipídica comum permeável a compostos lipossolúveis (LEMONICA; DAMASCENO, DISTASI, 1996). Essa permeabilidade do tecido materno-fetal aumenta os riscos de ocorrências de efeitos adversos no desenvolvimento embrionário, que podem se dar por indução direta dos xenobióticos ou de seus metabólitos que tenham sido capazes de agir nos tecidos fetais ou de forma indireta, ao causarem, por exemplo, efeitos toxicológicos nas progenitoras, alterando sua homeostase (TYL; CHERNOFF; ROGERS, 2007).

Adicionalmente, o tratamento durante 10 dias com EPP_m também não promoveu alterações significativas nos parâmetros bioquímicos renais e hepáticos das fêmeas tratadas, tendo em vista que não foram observadas alterações nas concentrações de TGO, TGP, creatinina, ureia, fosfatase alcalina, proteínas totais e albumina. Observa-se que esses resultados indicam baixa toxicidade do extrato, uma vez que severas alterações fisiológicas e/ou patológicas em órgãos vitais como os rins e o fígado, possivelmente, seriam mensuráveis no sangue, que é uma fonte de informações fisiológicas em resposta às injúrias ou ao estresse materno sofridos pelo organismo das progenitoras (MUKINDA; EAGLES, 2010).

Em resumo, o fato de o tratamento com EPP_m nas 2.000, 2.500 e 3.000 mg/kg ter reduzido significativamente o ganho de massa corporal nas fêmeas dos três grupos tratados, sob condições normais de alimentação e apenas durante o período de tratamento, foi suficiente para atestar a ocorrência de toxicidade materna (US EPA, 1996).

No que tange a toxicidade materna, como a redução significativa no ganho de massa corporal das progenitoras foi observada, inclusive, na menor dose testada (2.000 mg/kg), não foi possível determinar o NOAEL (*No observed adverse effects level*) para o EPP_m neste estudo. Ademais, os resultados indicaram que a redução no ganho de massa corporal das progenitoras observada nos três grupos tratados com EPP_m não apresentou uma relação dose dependente, sendo mais expressiva no grupo que recebeu a menor dose (2.000 mg/kg). Como boa parte dos estudos toxicológicos do desenvolvimento não utilizam mais do que quatro

doses, muitas vezes, é difícil estabelecer uma clara relação dose-resposta (CHAHOU; PAUMGARTTEN, 2009).

5.2.2 Toxicologia do desenvolvimento

+

Não foram observadas alterações na morfologia externa dos 500 fetos analisados, exceção feita aos três casos, estatisticamente não significativos, de fetos com baixo peso e tamanho.

Na análise esquelética fetal, buscou-se identificar a presença de variações e malformações esqueléticas que pudessem estar diretamente relacionadas ao tratamento com o EPP_m. Nesse sentido, foram adotados os conceitos de variação e malformação conforme apresentados no *II Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology* realizado em Berlin, no ano de 2002. Nesse evento, malformação foi definida como uma mudança estrutural permanente que provavelmente afetará adversamente a sobrevivência e a saúde da espécie sob investigação. Já o termo variação foi definido como uma mudança que ocorre dentro da população normal e que é improvável que seja capaz de afetar adversamente a sobrevivência e a saúde da espécie sob investigação. Essa mudança deve incluir atrasos no crescimento e na morfogênese que tenham sido seguidos de padrões normais de desenvolvimento (CHAHOU et al., 1999). Além dos critérios de permanência ou reversibilidade na vida pós-natal dos animais experimentais, a categorização de uma observação em variação ou malformação deve levar em conta suas frequências de ocorrências espontâneas, bem como sua relação com quadros de toxicidade materna apresentados pela espécie sob investigação. Ademais, é importante investigar e atribuir a relevância e significado de cada alteração para a população humana (TYL; CHERNOFF; ROGERS, 2007).

Baseados em tais considerações acerca dos conceitos de variação e malformação, os resultados deste estudo compreenderam, em sua maioria, variações esqueléticas. Nesse sentido, foram observados, sobretudo, atrasos em sítios de ossificação nos ossos do crânio, no esterno e nas patas anteriores e posteriores, classificados como variações. Embora a ossificação retardada esteja frequentemente associada a estados de carência nutricional provocados pela redução no consumo de ração (KILANOWICZ et al., 2015), os resultados de ossificação incompleta deste estudo são de natureza diversa, possivelmente um efeito secundário decorrente da interação de fatores indiretos de toxicidade, uma vez que não houve variação significativa no consumo de ração entre os grupos tratados com EPP_m e o grupo controle.

A incidência elevada de ossificação incompleta do esterno nos grupos 2.000 e 2.500 mg/kg também foi classificada como uma variação neste estudo, uma vez que estados de ossificação retardada que não resultem na ausência do osso em questão são assim categorizados, pois, geralmente, são achados plenamente reversíveis no período pós-natal (CARNEY; KIMMEL, 2007). Além disso, apresentam frequências de ocorrências espontâneas relativamente elevadas em ratos (SOLECKI et al., 2001). Todavia, segundo estudo de Chahoud e Paumgartten (2005), um alto grau de ossificação completa dos seis sítios do esterno, próxima de 100%, foi constatada na análise retrospectiva de dados referentes a mais de 1400 fetos pertencentes a grupos controle e sacrificados a termo (DG 21).

Outras observações significativas, como o esterno bipartido, foram identificadas no grupo que recebeu EPP_m na dose de 2.000 mg/kg. Trata-se, neste caso, de uma observação de difícil enquadramento, uma vez que, como as cartilagens não sofreram processo específico de coloração no presente estudo, não foi possível garantir se tratava de um simples atraso na ossificação de alguns sítios do esterno ou se houve anomalia na formação do osso, que seria uma alteração de maior gravidade. De maneira análoga, no caso da ausência de sítios de ossificação do esterno, a coloração das cartilagens também seria crucial para determinação da natureza do achado como um atraso na ossificação dos sítios ausentes ou como falta de parte do osso (AUGUSTINE-RAUCH, 2007).

Em relação aos ossos das patas, metacarpos, metatarsos, falanges anteriores e posteriores, foi verificado um padrão variável de desenvolvimento ósseo no 21º dia gestacional, assim como descrito por Kimmel, Garry e DeSesso (2014). Esses autores afirmam que tal variabilidade pode ocorrer tanto nas taxas quanto no padrão de ossificação, sendo perceptível até mesmo dentro de uma mesma ninhada. Adicionalmente, nenhum feto apresentou ossificação completa das patas anteriores ou posteriores, incluindo aqueles pertencentes ao grupo controle. Nesse sentido, Pinto (2004) descreve que o atraso e ausência de ossificação dos metacarpos, metatarsos e falanges é comum em ratos Wistar e, geralmente, são reversíveis nos primeiros dias do período pós-natal. Contrapondo este estudo, Chahoud e Paumgartten (2005) mostraram que no DG 21 há elevado grau de ossificação completa de metatarsos, metacarpos e falanges distais em ratos Wistar. Acrescentaram ainda, que a ocorrência simultânea de baixo peso fetal no DG 21 e retardo na ossificação das patas anteriores e posteriores e das vértebras cervicais e sacrococcígeas pode ser indicativo de retardo no desenvolvimento fetal. Considerando essa perspectiva, as observações de retardo na ossificação de metacarpos (2.500 mg/kg), falanges anteriores (2.500 mg/kg) e metatarsos (2.000 e 2.500 mg/kg) no presente estudo não foram categorizadas como retardo no desenvolvimento fetal, uma vez que não houve redução no peso

dos fetos. Ademais, o peso fetal médio de $4,5 \pm 0,5$ g verificado no presente estudo encontra-se dentro da faixa indicada como normal na análise retrospectiva de dados de 769 ninhadas de grupos controle realizada por Chahoud e Paumgarten (2005).

No caso das observações de costelas rudimentares, supranumerárias e curtas, apenas as primeiras mostraram significância estatística. Ainda assim, pelo fato de tais observações mostrarem-se transitórias em ratos (ROGERS et al., 1991), todas foram classificadas como variações neste estudo, embora seu significado na vida pós-natal de ratos Wistar permaneça controverso e pouco descrito (FOULON et al., 1999). Kimmel e Wilson (1973), em estudo pioneiro de toxicidade reprodutiva, consideraram como variações apenas as costelas rudimentares, categorizando a presença de costelas supranumerárias como malformações. Por outro lado, Chernoff et al. (1991) em um importante estudo realizado no período pós-natal mostraram que a presença de costelas supranumerárias varia entre as espécies, mostrando-se permanente em camundongos e transitória em ratos. A variabilidade interespecífica das observações de costelas supranumerárias também é mostrada em estudos de estresse materno, que possui claro papel indutor desta alteração em camundongos e nenhum efeito sobre ratos (BEYER; CHERNOFF, 1986). Tais divergências no enquadramento de uma mesma observação, como a presença de costelas supranumerárias, por exemplo, são devidas à falta de conhecimentos sobre seus impactos na saúde e na sobrevivência do animal, o que tem sido tema central na área de toxicidade reprodutiva (SOLECKI et al., 2013). Discutidas pela comunidade científica internacional em uma série de workshops, é consenso que essas dificuldades só poderão ser superadas à medida que estudos realizados no período pós-natal avaliem o real impacto da observação em questão na sobrevivência e na saúde do animal afetado (PAUMGARTTEN et al., 2009; SOLECKI et al., 2013). Todavia, o *IV Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology* chamou a atenção dos pesquisadores para o fato de que qualquer mudança estrutural permanente, ainda que não afete adversamente a saúde ou a vida do animal teste, deve ser considerada um risco para humanos (SOLECKI et al., 2003). No caso específico das costelas supranumerárias, sua presença em humanos tem sido descrita geralmente como assintomática (TYL; CHERNOFF; ROGERS, 2007) ou associada a casos de dores nas costas (CHERNOFF et al., 1991).

Finalmente, a única observação de malformação identificada neste estudo, uma anomalia congênita na coluna cervical de seis fetos de uma mesma ninhada de 13 indivíduos, revelou-se sem significância estatística. Ademais, por afetar apenas parcialmente uma única ninhada, não pode, portanto, ser atribuída ao tratamento com EPp_m de forma inequívoca. Possivelmente, sua origem possa estar na interação entre fatores indiretos desencadeadores de

anomalias espontâneas que não devem ser confundidas com efeitos teratológicos do extrato testado (LANSDOWN, 1976 apud CHERNOFF et al., 1991).

Novamente, os achados de variações esqueléticas fetais observadas nos três grupos tratados com EPP_m não apresentaram uma relação de dose dependência clara. Nesse sentido, Marques et al. (2010), ao analisarem os efeitos teratogênicos do extrato de *Morinda citrifolia* L. administrado durante a organogênese de ratas Wistar, também não verificaram uma relação de dose-resposta diretamente proporcional. Ademais, Chahoud e Paumgarten (2009) ao analisarem a relação de dose-resposta sobre o desenvolvimento esquelético de ratos Wistar mostraram que, na maioria dos casos, a ocorrência da variação observada é diretamente proporcional à dose testada. Entretanto, também relataram casos de variações esqueléticas significativas não relacionadas à dosagem, como a ocorrência de costelas onduladas e vértebras centrais lombares bipartidas.

Portanto, ainda que os resultados indiquem baixa toxicidade geral para a espécie *P. pseudocaryophyllus*, é importante ressaltar que esse é o primeiro estudo realizado sobre o tema. Assim, como em qualquer investigação que demonstre ausência de efeitos tóxicos para determinado agente, deve-se considerar a realização de pesquisas adicionais voltadas para o estabelecimento da absorção e da biodisponibilidade da substância teste (US EPA, 1998).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste primeiro estudo de toxicidade reprodutiva do extrato seco obtido das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, quimiotipo (*E*)-metiliseugenol, mostraram que o tratamento de ratas Wistar com esse extrato produziu baixa toxicidade materna e nenhum efeito teratogênico significativo. Todavia, ainda que este estudo tenha sido realizado em um período crítico do desenvolvimento embrionário de ratas, trata-se de um tratamento de curta duração, sendo assim, precauções devem ser tomadas até que se tenham informações disponíveis sobre terapias prolongadas com EP_pm.

Portanto, estudos futuros serão necessários até que o completo perfil toxicológico de *P. pseudocaryophyllus* seja definido, incluindo análises que abarquem outros períodos do desenvolvimento de mamíferos, outras vias e doses de administração, bem como outras espécies de animais. Por fim, é importante destacar que, diante do fato de a espécie apresentar polimorfismo químico, é razoável supor que diferentes quimiotipos apresentem perfis toxicológicos distintos. Dessa forma, as investigações futuras deverão buscar, ainda, estabelecer a toxicidade comparativa entre os quimiotipos da espécie *P. pseudocaryophyllus*.

7 CONCLUSÃO

Baseado na análise e na interpretação dada aos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- O EP_{p_m} pode ser produzido pela técnica de secagem por nebulização com rendimento satisfatório e preservação de constituintes do fitocomplexo, inclusive, de substâncias voláteis, como o (*E*)-metiliseugenol. Ademais, a identificação do EP_{p_m} pôde ser ratificada em CLAE pela presença dos marcadores químicos ácido gálico, catequina, quercitrina e (*E*)-metiliseugenol em seu perfil cromatográfico;

- O tratamento com EP_{p_m} nas doses de 2.000, 2.500 e 3.000 mg/kg induz toxicidade materna leve, provocando apenas redução no ganho de massa corporal, sem contudo apresentar qualquer impacto sobre os consumos de água e ração, sobre o desempenho reprodutivo e sobre os parâmetros bioquímicos renais e hepáticos avaliados nas progenitoras;

- O EP_{p_m} não possui efeito teratogênico quando administrado nas doses de 2.000, 2.500 e 3.000 mg/kg durante o período da organogênese de ratas Wistar, uma vez que não foram identificadas alterações da normalidade no desenvolvimento externo e esquelético de suas proles que pudessem ser diretamente relacionadas ao tratamento.

REFERÊNCIAS

ACIOLE, S. D. G. **Avaliação da atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como alternativa de controle às larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).** 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) – Departamento de Biologia Animal, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos.** Brasília, DF, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%93nicos+-+vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 1 nov. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26, de 13 de maio de 2014.** Brasília, DF, 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a9e43d0044140f579b5affb9cd167b7c/rdc0026_13_05_2014.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 1 nov. 2014.

ALBUQUERQUE, L. B. L. et al. Assessment of cytotoxicity, fetotoxicity, and teratogenicity of *Plathymenia reticulata* Benth barks aqueous extract. **Biomed Research International**, v. 2013, Article ID 128594, 8 pages, 2013.

AUGUSTINE-RAUCH, K. Alternative experimental approaches for interpreting skeletal findings in safety studies. **Birth Defects Research**, v. 80, p. 497-504, 2007.

BERG, O. K. Myrtaceae. In: von Martius, C. F. P. **Flora Brasiliensis**, vol. 14, p. 426-430, 1858. Disponível em: <<http://florabrasiliensis.cria.org.br/fviewer>>. Acesso em: 1 nov. 2014.

BEYER, B. K et al. ILSI/HESI Maternal Toxicity Workshop Summary: maternal toxicity and its impact on study design and data interpretation. **Birth Defects Research**, v. 92, p. 36-51, 2011.

BEYER, P. E.; CHERNOFF, N. The induction of supernumerary ribs in rodents: the role of maternal stress. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 6, p. 419-429, 1986.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade brasileira. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade dos biomas brasileiros.** Brasília, DF, 2002. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/biodivbr.pdf>. Acesso em 01 nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Casa Civil. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá Outras Providências.** Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato20042006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acesso em: 1 nov. 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico**. Brasília, DF, 2009a. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS)**. Brasília, DF, 2009b. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2014.

CABRAL, A. C. S.; SAID, S.; OLIVEIRA, W. P. Retention of the enzymatic activity and product properties during spray drying of pineapple stem extract in presence of maltodextrin. **International Journal of Food Properties**, v. 12, p. 536-548, 2009.

CAMPANINI, M. Z. et al. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-INDUCED oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 127, p. 153-160, 2013.

CAMPANINI, M. Z. et al. Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: in vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative stress. **American Association of Pharmaceutical Scientists - PharmSciTech**, v. 15, n. 1, 2014.

CAMPBELL, M. A. et al. Reduced water intake: implications for rodent developmental and reproductive toxicity studies. **Birth Defects Research**, v. 86, p. 157-175, 2009.

CARNEY E. W.; KIMMEL, C. A. Interpretation of skeletal variations for human risk assessment: delayed ossification and wavy ribs. **Birth Defects Research**, v. 80, p. 473-496, 2007.

CHAHOU, I. **Atlas of External and Skeletal Anomalies in Rats**. CD-ROOM. Berlim: PR&C Multimídia, Leipzig, 1997.

CHAHOU, I. et al. Classification terms in developmental toxicity: need for harmonization. Report of the Second Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology Berlin, 27-28 August 1998. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 01, p. 77-82, 1999.

CHAHOU, I.; PAUMGARTTEN, F. Dose-response relationships of rat fetal skeleton variations: relevance for risk assessment. **Environmental Research**, v. 109, p. 922-929, 2009.

CHAHOU, I.; PAUMGARTTEN, F. Relationships between fetal body weight of Wistar rats at term and the extent of skeletal ossification. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 565-575, 2005.

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

CHERNOFF, N. et al. Significance of supernumerary ribs in rodent developmental toxicity studies: postnatal persistence in rats and mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 17, p. 448-453, 1991.

CRAVEIRO A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza, CE: Universidade Federal do Ceará. 1981.

CUSTÓDIO, D. L. et al. Antimicrobial activity of essential oils from *Pimenta pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1363-1369, 2010.

D'ANGELIS, A. S. R. **Extrativismo e comercialização de Cataia - *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) – na Ilha do Superagui (Guaraqueçaba, PR): situação atual, implicações e perspectivas**. 2013. 89 f. **Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)** - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2013.

D'ANGELIS, A. S. R.; NEGRELLE, R. R. B. *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum: aspectos botânicos, ecológicos, etnobotânicos e farmacológicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 607-617, 2014.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Guideline for reproductive toxicity risk assessment EPA/630/R96/009**. Washington, EUA: U. S. EPA, 1996. Disponível em: < http://www2.epa.gov/sites/production/files/2014-1/documents/guidelines_repro_toxicity.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2014.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Health effects test guideline OPPTS 870.3800 reproduction and fertility effects**. Washington, EUA: U. S. EPA, 1998. Disponível em: < https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/epa/epa_870_3800.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2014

EL ASSAL, F. E. et al. *Pimenta pseudocaryophyllus* inhibits virulence factors and promotes metabolic changes in *Candida* yeast. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 5, p. 618-623, 2014.

EZEJA M. I.; ANAGA A. O.; ASUZU I. U. Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 1155-1164, 2014.

FAJEMIROYE, J. O. et al. Antidepressive-like property of dichloromethane fraction of *Pimenta pseudocaryophyllus* and relevance of monoamine metabolic enzymes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, Article ID 659391, 2013.

FAJEMIROYE, J. O. et al. Involvement of 5-HT1A in the anxiolytic-like effect of dichloromethane fraction of *Pimenta pseudocaryophyllus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 872-877, 2012a.

FAJEMIROYE, J. O. et al. Central activities of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum. **International Journal of Medicine and Aromatic Plants**, v. 2, n. 1, p. 118-122, 2012b.

FARIAS, V. et al. Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 398-406, 2009.

FARMACOPEIA BRASILEIRA II. 2. ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959.

FERNANDES, O. F. L. et al. Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, on melanized and non-melanized *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 174, p. 421-428, 2012.

FINNELL, R. H. Teratology: general considerations and principles. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 103 (2), p. S337-S342, 1999.

FOULON, O. et al. Induction of supernumerary ribs with sodium salicylate. **Reproductive Toxicology**, v. 13, p. 369-374, 1999.

GARCIA, M. D. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. azua (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91 (1), p. 69-73, 2004.

GIRARD, E. A. **Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum) em floresta ombrófila mista**. 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2005.

HANSEN, D.L.; OLSEN, J. Serious life events and congenital malformations: a national study with complete follow-up. **Lancet**, v. 356, n. 9233, p. 875, 2000.

HONG J. et al. Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 159-171, 2014.

HOUAISS, Antônio. **Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa**. Rio de Janeiro, Ed. Objetiva, 2009.

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

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

KELLY, W. L.; BRYDEN, M. M. A modified differential stain for cartilage and bone in whole mount preparations of mammalian fetuses and small vertebrates. **Stain Technology**, v. 58, n. 3, p. 131-134, 1983.

KHERA, K. S. Maternal toxicity – A possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology**, v. 29, p. 411-416, 1984.

KILANOWICZ, A. et al. Developmental toxicity of hexachloronaphthalene in Wistar rats. A role of CYP1A1 expression. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 93-103, 2015.

- KIM, J. R. et al. Fumigant toxicity of plant essential oils against *Camptomyia corticalis* (Diptera: Cecidomyiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105 (4), p. 1329-1334, 2012.
- KIMMEL, C. A.; GARRY, M. R.; DESESSO, J. M. Relationship between bent long bones, bent scapulae, and wavy ribs: malformations or variations? **Birth Defects Research**, v. 101, p. 379-392, 2014.
- KIMMEL, C. A.; WILSON, J. G. Skeletal deviations in rats: malformations or variations? **Teratology**, v. 8, p. 309-316, 1973.
- KIKUZAKI, H. et al. Antioxidative phenylpropanoids from berries of *Pimenta dioica*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1307-1312, 1999.
- LACHMAN, L., LIEBERMAN, H. A., KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste, 2001.
- LANDRUM, L.R. **Flora Neotropica: Monograph 45: Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma (Myrtaceae)**. New York, NY: Organization for Flora Neotropica, 1986.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.
- LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas. In: REITZ, R. **Flora ilustrada catarinense**. Santa Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues, 1978.
- LEMONICA, I. P.; DAMASCENO, D. C.; DI-STASI L. C. Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 2, p. 223-227, 1996.
- LIMA, M. E. L. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State – Brazil. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 589-593, 2006.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.
- LULLEZ, J. C. **Identificação de metileugenol, eugenol e chavibetol no óleo essencial da folha de Pseudocaryophyllus acuminatus (Limk) Burret**. 1991. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 1991.
- MAKRIS, S. L. et al. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 2). **Reproductive Toxicology**, v. 28, p. 371-434, 2009.

MANSON, J. M.; ZENICK, H.; COSTLOW, R. D. Principles and methods of toxicology. In: WALLACE, H. **Teratology. Test Methods for Laboratory Animals**. New York, NY: Raven Press, 1982.

MARQUES, F. A. et al. Leaf essential oil composition of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum native from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 2, p. 150-152, 2010.

MARQUES, N. F. Q. et al. Delayed ossification in Wistar rats induced by *Morinda citrifolia* L. exposure during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 85-91, 2010.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M. et al. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 108 (2), p. 481-487, 2011.

MORGANTE, P. G. et al. Development of microsatellite markers for *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae), a wild South American species. **American Journal of Botany**, p. e434-e436, 2012.

MUKINDA, J. T.; EAGLES, F. K. Acute and sub-chronic oral toxicity profile of the aqueous extract of *Pohy gala fruticosa* in female mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 236-240, 2010.

NAKAOKA SAKITA, M. et al. Óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae) I: cromatografia a gás/espectrometria de massa (CG/EM). **Revista do Instituto Florestal**, v. 6, p. 53-61, 1994.

OLIVEIRA, W. O.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20 (4), p. 641-650, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **WHO Monographs on selected medicinal plants**. Genebra, Suíça, 1999. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/>>. Acesso em: 1 nov. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005**. Genebra, Suíça, 2002. Disponível em: <http://www.wpro.who.int/health_technology/book_who_traditional_medicine_strategy_2002_2005.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023**. Genebra, Suíça, 2014. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/>>. Acesso em: 1 nov. 2014.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Reproduction /Developmental Toxicity Screening Test, nº 421**. Paris, FR: OECD, 1995.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, nº 423**. Paris, FR: OECD, 2001.

PAULA, J. A. M. **Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum – Myrtaceae**. 2006. 139 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2006.

PAULA, J.A.M. **Fitoquímica e atividades biológicas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae)**. Tese (Doutorado em Biologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2011.

PAULA, J. A. M. et al. Infraespecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 643-650, 2011.

PAULA, J. A. M. et al. Gênero *Pimenta*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 363-379, 2010.

PAULA, J. A. M. et al. Phytochemical analysis and antimicrobial, antinociceptive and anti-inflammatory activities of two chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, article ID 420715, 15 pages, 2012.

PAULA, J. A. M. et al. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 265- 278, 2008.

PAULA, J. A. M. et al. Antimicrobial activity of the crude ethanol extract from *Pimenta pseudocaryophyllus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 10, p. 987-993, 2009.

PAUMGARTTEN, F. et al. Harmonization of terminology in developmental toxicology: the quest for a more precise description and a harmonized classification of fetal observations. **Reproductive Toxicology**, v. 27, p. 8-13, 2009.

PAVARINI, R.; ANSANTE, T. F.; CACERES, D. P. Efeito do extrato aquoso de plantas sobre a broca da bananeira *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). **Nucleus**, v. 7, p. 203-208, 2010.

PINTO, V. M. **Avaliação toxicológica da preparação fitoterápica contendo *Piper methysticum* Forst, Piperaceae, (Kava-kava®) sobre o desenvolvimento pré-natal em ratos Wistar**. 2004. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2004.

RIBEIRO, L. P. et al. *Pimenta pseudocaryophyllus* derivatives: extraction methods and bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 44, n. 6, p. 634-642, 2015.

ROGERS, J. M. et al. Developmental toxicity of bromoxynil in mice and rats. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 442-447, 1991.

ROGERS, J. M. et al. Evaluation and interpretation of maternal toxicity in segment II studies: issues, some answers, and data needs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, p. S367-s374, 2005.

SAENZ, M. T. et al. Antibacterial activity of essential oils of *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* and *Pimenta racemosa* var. *grisea*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 599-602, 2004.

SANTOS, B. C. B. **Fitoquímica e ensaios biológicos de óleos essenciais de *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Hedychium coronarium* da Mata Atlântica do Estado de São Paulo**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

SANTOS, B. C. B. et al. Isolation of chavibetol from essential oil of *Pimenta pseudocaryophyllus* leaf by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 4303-4306, 2009.

SARTIN, J. G. **Estudo comparativo do perfil cromatográfico dos extratos bruto e seco por aspersão de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) quimiotipo (*E*)-metilisoeugenol**. 2013. 57 f. Monografia (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO, 2013.

SEO, S. M. et al. Fumigant antitermitic activity of plant essential oils and components from Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*), caraway (*Carum carvi*), dill (*Anethum graveolens*), Geranium (*Pelargonium graveolens*), and Litsea (*Litsea cubeba*) oils against Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57 (15) p. 6596-6602, 2009.

SILVA, R. M. F. et al. Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14 (1), p. 103-109, 2012.

SOLECKI, R. et al. Harmonization of description and classification of fetal observations: achievements and problems still unresolved. Report of the 7th Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology, Berlin, 4-6 May 2011. **Reproductive Toxicology**, v. 35, p. 48-55, 2013.

SOLECKI, R. et al. Harmonization of rat fetal skeletal terminology and classification. Report of the 3th Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology, Berlin, 14-16 September 2000. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 6, p. 713-721, 2001.

SOLECKI, R. et al. Harmonization of rat fetal external and visceral terminology and classification. Report of the 4th Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology, Berlin, 18-20 April 2002. **Reproductive Toxicology**, v. 17, p. 625-637, 2003.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005.

SUÁREZ, A.; ULATE, G.; CICCIO, J. F. Efectos de la administración aguda y subaguda de extractos de *Pimenta dioica* (Myrtaceae) em rata albinas normotensas e hipertensas. **Revista de Biología Tropical**, v. 44, p. 39-45, 1997.

SUZUKI, E. Y. et al. Potential of the essential oil from *Pimenta pseudocaryophyllus* as an antimicrobial agent. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, p. 379-385, 2014.

TROPICOS. *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, var. *fulvescens* (DC.) Landrum. Tropicos.org, 2015. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/22103950?tab=images>>. Acesso em: 20 out. 2015.

TROPICOS. *Laurus nobilis* L. Tropicos.org, 2015. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/17804359?tab=images>>. Acesso em: 20 out. 2015.

TROPICOS. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry. Tropicos.org, 2015. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/22102278?tab=images>>. Acesso em: 20 out. 2015.

TYL, R. W.; CHERNOFF, N.; ROGERS, J. M. Altered axial skeletal development. **Birth Defects Research**, v. 80, p. 451-472, 2007.

WILSON, J. G. **Environment and birth defects**. New York: Academic Press, 1973.

XAVIER, P.P.S. et al. Toxicidade aguda do extrato seco de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, quimiotipo citral, em ratas Wistar. In: I CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG, 2014, Pirenópolis. **Anais...** Pirenópolis: UEG, 2014. 1 CD-ROM.

YOKOMIZO, N. K. S.; NAKAOKA SAKITA, M. Atividade antimicrobiana e rendimento do óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 513-520, 2014.

ZAMPIÉR, M. N. **Desenvolvimento, padronização e avaliação biológica de extratos nebulizados de *Dalbergia ecastaphyllum***. 2012. 172 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2012.

ANEXO

ANEXO A – Parecer consubstanciado emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

1. IDENTIFICAÇÃO

- 1.1. Título do Projeto: **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO SECO DE *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. LANDRUM DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO DE RATAS WISTAR**
- 1.1. Finalidade: Pesquisa
- 1.2. Protocolo CEP: 001/2013
- 1.3. Instituição onde será realizado: Universidade Estadual de Goiás / Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas
- 1.4. Data de apresentação à CEUA: 03/06/2013

2. OBJETIVOS

Geral:

- Avaliar a toxicidade do extrato seco de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum em ratas Wistar tratadas durante os períodos de organogênese e lactação

Específicos: Estudar os efeitos do tratamento com o extrato seco de *Pimenta pseudocaryophyllus* sobre os parâmetros de toxicidade reprodutiva materna; Avaliar se a administração do extrato seco de *Pimenta pseudocaryophyllus* altera o desempenho reprodutivo de ratas Wistar tratadas durante a organogênese; Avaliar se o tratamento com *Pimenta pseudocaryophyllus*, durante o período da organogênese determina o aparecimento de alterações esqueléticas fetais; Verificar os efeitos do tratamento materno com *Pimenta pseudocaryophyllus* durante a lactação sobre o desenvolvimento físico pós-natal da prole; Verificar os efeitos do tratamento materno com *Pimenta pseudocaryophyllus* durante a lactação sobre parâmetros comportamentais da prole; Avaliar se as ratas prenhes tratadas com o extrato seco de *Pimenta pseudocaryophyllus* apresentam toxicidade hepática e renal.

3. SUMÁRIO DO PROJETO

- 3.1. Descrição e caracterização da amostra: **adequado**
- 3.2. Condições de manutenção dos animais: **adequado**
- 3.3. Adequação de metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais: **não se aplica**
- 3.4. Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos: **não se aplica**
- 3.5. Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada: **não se aplica**
- 3.6. Anestésico/analgésico utilizado: **adequado**
- 3.7. Método de eutanásia: **adequado**
- 3.8. Destino do animal (caso não seja submetido à eutanásia): **adequado**

4. COMENTÁRIOS DO RELATOR FRENTE À LEI 11794/2008; DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS (DBCA); GUIA BRASILEIRO DE BOAS PRÁTICAS PARA A EUTANÁSIA DE ANIMAIS;

- A metodologia está adequada, assim como os procedimentos com os animais.

5. PARECER DA CEUA:

Considerando o projeto exposto, o mesmo foi considerado **APROVADO**.

Goiânia, 12 de setembro de 2013.

Marta Regina Magalhães
Prof. Ms. Marta Regina Magalhães
Coordenadora da CEUA/PUC Goiás

ANEXO B – Artigo científico submetido à revista Reproductive Toxicology.

Elsevier Editorial System(tm) for
Reproductive Toxicology
Manuscript Draft

Manuscript Number: 5016

Title: Reproductive toxicity evaluation of the dry extract obtained from the leaves of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae) in Wistar rats.

Article Type: Full Length Article

Keywords: Maternal toxicity; Developmental toxicity; Reproductive outcome; Biochemistry parameters; Skeletal observations; Fetuses; Malformations; Teratogenesis.

Corresponding Author: Mr. Bruce Soares Cardoso, Master

Corresponding Author's Institution: University State of Goias

First Author: Bruce Soares Cardoso, Master

Order of Authors: Bruce Soares Cardoso, Master; Vanessa Amaral, Doctor; Borges Kátia, Scientific Initiation; Joelma Paula, Doctor; José de Paula, Doctor; Wilson Cruvinel, Doctor

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Studies have established that leaves of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae) own a wide pharmacological potential. Despite its widespread traditional use, there was no scientific information about its toxicity, especially during pregnancy. This study aimed at investigating the reproductive toxicity of the dry leaf extract of the *P. pseudocaryophyllus*, (E)-methyl isoeugenol chemotype (EPpm), during the organogenesis period of Wistar female rats. The dams were distributed in groups which received EPpm, by gavage, at the doses of 0, 2000, 2500 or 3000 mg/kg during the organogenesis period. Body weight gain, food and water consumption reproductive outcome, biochemistry parameters and fetal skeletal alterations were recorded. The results showed that the EPpm treatment decreased the maternal body weight gain ($p \leq 0,05$). No other relevant maternal alterations were seen. In addition, no-treatment related skeletal malformations were recorded. In conclusion, the EPpm showed low maternal toxicity and no interference in the development of Wistar rats.