



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANNE CATHARINE TAVARES DE AZEVEDO MARINHO

ESTUDO TOXICOLÓGICO REPRODUTIVO DO EUGENOL

Recife

2018

ANNE CATHARINE TAVARES DE AZEVEDO MARINHO

ESTUDO TOXICOLÓGICO REPRODUTIVO DO EUGENOL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Recife

2018

M338e Marinho, Anne Catharine Tavares de Azevedo.
Estudo toxicológico reprodutivo do eugenol / Anne Catharine Tavares de Azevedo Marinho. – 2018.
74 f: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Organogênese. 2. Toxicidade. 3. Eugenol. 4. Reprodução. I.
Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

615.9 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2018-264)

ANNE CATHARINE TAVARES DE AZEVEDO MARINHO

ESTUDO TOXICOLÓGICO REPRODUTIVO DO EUGENOL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Aprovada em: 31/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
(Presidente e Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio
(Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho
(Examinador externo)
Centro Universitário do Vale do Ipojuca

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus por permitir que eu finalizasse esse mestrado e por colocar pessoas tão especiais no meu caminho para me socorrerem nos momentos mais difíceis.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) por possibilitar a realização desta pesquisa.

Ao pessoal da secretaria da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, especialmente a Nerilin e Rilvan pelos esclarecimentos e auxílio, inclusive nos finais de semana e feriados.

Ao pessoal do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Agradeço ao professor Almir Wanderley por ter me aceitado como orientanda, por compartilhar um pouco do seu conhecimento e por fornecer o espaço e equipamentos necessários para realização desse trabalho.

E não poderia deixar de agradecer à Jamilka Silva por tudo e mais um pouco. Agradeço pela sua preocupação, dedicação e capacidade de me acalmar quando eu já não conseguia mais me manter firme, pela ajuda na realização de experimentos nos finais de semana e feriados, pelos almoços inesperados, pela sua sabedoria, conhecimento, generosidade, ensinamentos, pela nossa amizade. Eu sou imensamente grata por tudo que você fez por mim durante esses dois anos de trabalho pesado e exaustivo.

Agradeço a todas as pessoas que me acolheram quando tudo parecia não ir como o esperado, que me abraçaram, choraram comigo e me fizeram rir, que me ajudaram a conduzir os experimentos tão cansativos mesmo em finais de semana e feriados. Henrique Bandeira, Lady Travassos, Jéssica Figueiredo, Hyago Teixeira, Daíllo Augusto, Samara Brito, Cynthia Layse, Temístocles l'talo, gratidão por ter tido a oportunidade de conhecer e conviver com vocês, sem o apoio de vocês as pedras no caminho teriam virado montanhas e os dias não teriam graça.

Ao pessoal do LFTPCPB, todos contribuíram de formas diferentes uns apoiaram o meu ingresso no mestrado, outros me ensinaram técnicas, tiraram dúvidas, auxiliaram no meu crescimento enquanto mestranda ou apenas me incentivaram a não desistir quando as coisas ficaram difíceis.

Ao meu namorado, Paulo Salgado Filho, pela dedicação e carinho, por se disponibilizar a passar as férias e virar noites me ajudando a organizar e finalizar esse trabalho, por me acalmar nos momentos mais difíceis e por todos os bons momentos compartilhados ao longo dos últimos quatro meses.

A toda minha família, que mesmo sem entender minhas ausências sempre se mostraram solícitos e dispostos a ajudar e por todo carinho e incentivo ao longo dessa caminhada. Minha gente sem vocês a vida não teria sentido, amo vocês.

À minha mãe, Hélia Azevedo, que sempre sacrificou tudo pra que eu e minha irmã pudéssemos ter uma oportunidade melhor. Por me acolher, me ajudar a

estudar pra seleção do mestrado, por ser a pessoa que me socorre, me mima, me faz rir, que utiliza suas folgas do trabalho para vir cuidar de mim em Recife no momento que eu mais preciso e por ser meu exemplo de caráter e determinação. Mãe te agradeço pela minha vida e pela sua existência. Amo você.

A todos vocês que me apoiaram e contribuíram para realização desse trabalho meu muito obrigada.

RESUMO

O eugenol é um óleo essencial, presente em diversas espécies vegetais, inclusive no cravo-da-índia e tem despertado o interesse das indústrias farmacêutica e odontológica devido a suas propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e neuroprotetora. Apesar das atividades biológicas já comprovadas, poucos estudos avaliaram a segurança de uso do eugenol durante a gestação. Dessa forma, este trabalho avaliou os efeitos da administração oral do eugenol em ratas Wistar prenhes, nos períodos de pré-implantação e organogênese. Ratas foram colocadas em contato com machos adultos na proporção 1:1. No dia seguinte, a presença de espermatozoides no lavado vaginal associada à observação da fase estro do ciclo estral, identificou as ratas prenhes, marcando o dia zero (D₀) de prenhez. Dessa forma, oito grupos experimentais foram divididos em controle (água + tween 80 à 2%) ou EUG (eugenol + tween 80 à 2%), nas doses de 37,5, 187,5 e 375 mg/kg/dia. A administração dos grupos ocorreu na pré-implantação (D₀ a D₅) ou na organogênese (D₆ a D₁₅) e as ratas foram eutanasiadas no 21º dia de prenhez. Na pré-implantação houve alteração nos órgãos maternos e redução das massas relativas das placentas (C:1,62 ± 0,09%) nas doses de 37,5 (0,04 ± 0,00%), 187,5 (0,04 ± 0,00 %) e 375 mg/kg (0,03 ± 0,00%). Ocorreu redução significativa na implantação dos blastocistos, de 85,7 e 86,8%, nas doses de 37,5 e 187,5 mg/kg, respectivamente. E aumento de perda pré-implantação de 28,6, 25 e 20,2%, nas doses 37,5, 187,5 e 375 mg/kg, respectivamente. A taxa de perda pós-implantação na dose de 375 mg/kg (20,2%) foi maior em relação ao controle. Um feto natimorto foi registrado nas doses de 37,5 e 187,5 mg/kg e dois fetos na dose de 375 mg/kg. O tratamento durante a organogênese causou alteração nos órgãos maternos, redução dos índices placentários (11%) em relação aos seus respectivos controles (12%) e alterações esqueléticas foram observadas nas três doses do tratamento. Em conclusão, o eugenol causou toxicidade nas progenitoras e nos fetos, os resultados da pré-implantação sugerem redução na capacidade reprodutiva e implantação dos blastocistos no útero. Na organogênese as três doses causaram alterações no desenvolvimento ósseo dos fetos, o que sugere toxicidade.

Palavras-chave: Organogênese. Toxicidade. Eugenol. Reprodução.

ABSTRACT

Eugenol is an essential oil, which is present in many vegetables species including clove, and has called attention of pharmaceutical and odontological industries due to its anti-inflammatory, antimicrobial and neuroprotective properties. Despite biological activities already proven, few studies have evaluated the safety of eugenol during gestation. Thus, this study evaluated the effects of oral administration of eugenol in pregnant Wistar rats during pre-implantation and organogenesis period. Female rats were placed in contact with adult males rats in a 1:1 proportion. The following day, the presence of spermatozoa in the vaginal lavage associated with the estrus phase of the estrous cycle identified the pregnant rats, marking day zero (D0) of pregnancy. Thus, eight experimental groups were divided into control (water + 2% tween 80) or EUG (eugenol + 2% tween 80) at the doses 37.5, 187.5 and 375 mg/kg/day. Groups were administered in the pre-implantation (D0 to D5) or organogenesis (D6 to D15) phases and rats were euthanized on the 21st day of pregnancy. In the pre-implantation there were alterations in maternal organs and reduction of the mass of placenta (C: $1.62 \pm 0.09\%$) at the doses of 37.5 ($0.04 \pm 0.00\%$), 187.5 ($0.04 \pm 0.00\%$) and 375 mg/kg ($0.03 \pm 0.00\%$). There was a significant reduction in the implantation of blastocysts of 85.7 and 86.8% at doses of 37.5 and 187.5 mg/kg, respectively. The pre-implantation loss was increased by 28.6, 25 and 20.2% at doses 37.5, 187.5 and 375 mg/kg, respectively. The post-implantation loss rate at 375 mg/kg (20.2%) was higher than the control group. One stillborn fetus was recorded at doses of 37.5 and 187.5 mg/kg and two fetuses at dose of 375 mg/kg. The Treatment during organogenesis caused changes in maternal organs, reduction of placental indices (11%) in relation to their respective controls (12%) and skeletal changes were observed in the three treatment doses. In conclusion, eugenol caused toxicity in the progenitors and fetuses. The results in the pre-implantation phase suggest reduction in the reproductive capacity and implantation of the blastocysts in the uterus. In organogenesis, the three doses caused changes in the fetal bone development, suggesting fetal toxicity.

Key password: Organogenesis. Toxicity. Eugenol. Reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do monoterpene eugenol.....	18
Figura 2 – As quatro fases do ciclo estral de ratas wistar	26
Figura 3 – Esquema representativo do período gestacional de ratas wistar	27
Figura 4 – Esquema representativo da distribuição e doses utilizadas por grupo durante as fases de pré-implantação e organogênese de ratas wistar e método de eutanásia dos animais.	31
Figura 5 – Fetos submetidos à análise visceral (a) e esquelética (b).....	34
Figura 6 – Consumo de água (ml/dia/animal) de ratas prenhes durante a pré-implantação	39
Figura 7 – Consumo de ração (g/dia/animal) de ratas prenhes durante a pré-implantação	40
Figura 8 – Ganho de massa corporal (g) de ratas prenhes durante a pré-implantação	41
Quadro 1 – Relação das alterações observadas nos órgãos maternos durante fase de pré-implantação (d ₀ a d ₅).	42
Figura 9 – Consumo de água (ml/dia/animal) de ratas prenhes durante organogênese.....	46
Figura 10 – Consumo de ração (g/dia/animal) de ratas prenhes durante organogênese.....	47
Figura 11 – Ganho de massa corporal (g) de ratas prenhes durante a organogênese.	48
Quadro 2 – Relação das alterações observadas nos órgãos maternos durante fase de organogênese (d ₆ a d ₁₅).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da administração oral do eugenol sobre a massa absoluta (g) e relativa (%) dos órgãos maternos durante o período de pré-implantação em ratas wistar	43
Tabela 2 – Parâmetros reprodutivos de ratas wistar tratadas com eugenol do dia 0 a 5 da prenhez (período de pré-implantação).....	45
Tabela 3 – Efeito da administração oral do eugenol sobre a massa absoluta (g) e relativa (%) dos órgãos maternos durante o período de organogênese em ratas wistar	50
Tabela 4 - Parâmetros reprodutivos de ratas wistar tratadas com eugenol do dia 6 a 15 da prenhez (período de organogênese).....	52
Tabela 5 – Relação das malformações esqueléticas dos fetos de fêmeas tratadas com eugenol durante período de organogênese (d ₆ a d ₁₅)	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1	Uso de plantas medicinais na gestação	15
3.2	Óleos essenciais	16
3.3.1	Propriedades farmacológicas do eugenol	19
3.3.2	Estudos toxicológicos do eugenol	22
3.4	Estudos toxicológicos reprodutivos pré-clínicos com ratos wistar..	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Animais	29
4.2	Reagentes	29
4.3	Acasalamento	29
4.4	Grupos experimentais e doses utilizadas	30
4.5	Análise da toxicidade materna.....	31
4.6	Avaliação da performance reprodutiva materna	31

4.6.1	Avaliação da embriofetotoxicidade	33
4.6.2	Análise das alterações e/ou malformações fetais na organogênese	33
4.6.2.1	<i>Análise visceral</i>	34
4.6.2.2	<i>Análise esquelética</i>	35
4.7	Análises estatísticas	37
5	RESULTADOS.....	38
5.1	Toxicidade materna.....	38
5.1.1	Sinais clínicos de toxicidade	38
5.1.2	Consumo de água, ração e ganho de massa materno na pré- implantação	38
5.1.3	Parâmetros reprodutivos na pré-implantação	41
5.1.4	Consumo de água, ração e ganho de massa materno na organogênese	46
5.1.5	Parâmetros reprodutivos na organogênese	48
5.2	Embriofetotoxicidade nos períodos de pré-implantação e organogênese	53
5.3	Análise de alterações e/ou malformações internas durante organogênese.....	53
5.3.1	Análises visceral e esquelética.....	53
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA	74

1 INTRODUÇÃO

Durante a gestação, o organismo materno passa por transformações e oscilações hormonais importantes para favorecer as adaptações anatômicas e fisiológicas necessárias à nutrição e o desenvolvimento fetal (SOMA-PILLAY et al., 2016). As demandas fisiológicas são maiores neste período e por isso efeitos indesejáveis, já bem conhecidos, como enjoos, tonturas, mal-estar e dores de cabeça podem aumentar a procura por produtos naturais, com a falsa ideia de que os mesmos não trarão problemas para a mãe e o conceito. Apesar das plantas medicinais serem consideradas como produtos naturais, estas contêm compostos bioativos relacionados tanto com efeitos terapêuticos quanto com toxicidade, devendo ser estudados para garantir a segurança de uso (NORDENG; HAVNEN, 2005). Alguns desses compostos estão presentes no cotidiano de gestantes, podendo ser encontrados em formulações farmacêuticas, produtos alimentícios, itens de perfumaria e limpeza, a exemplo do eugenol.

O eugenol é um óleo essencial, presente em diversas espécies vegetais, conhecido por ser o componente majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.). Apresenta propriedades anti-inflamatória (MAGALHÃES et al., 2010), antioxidante (YOGALAKSHMI; VISWANATHAN; ANURADHA; 2010; GÜLÇİN, 2011), antimicrobiana (SILVA et al., 2018), ansiolítica (WANG et al., 2017), neuroprotetora (SAID; RABO, 2017), antinociceptiva (BÓ et al., 2013), anticâncer (SHARMA; SHARMA; PANDEY, 2016), entre outras.

A toxicidade em doses repetidas do eugenol por via oral nas doses de 1400 a 4000 mg/kg durante um período de 34 dias promoveu lesões hepáticas e renais em roedores e doses acima de 2000 mg/kg resultaram na morte de alguns animais (HAGAN et al., 1965). Enquanto que o eugenol nas doses de 20 e 30 µg/100 g de massa corporal por via intramuscular promoveu dano hepático em ratos após 10 dias de tratamento (SOUNDRAN et al., 1994). Além disso, a exposição de sapos africanos (*Xenopus laevis*) ao eugenol (375 µL/L) por banho de imersão durante 24 horas resultou em lesões renais e animais expostos por 72h apresentaram toxicidade renal, hepática e pulmonar. Contudo, a interrupção da exposição por um período de duas semanas foi capaz de recuperar as lesões (GOULET; VACHON; HÉLIE, 2011), sugerindo que a toxicidade não clínica desse óleo essencial está relacionada com o aumento da dose e do tempo de exposição.

Os estudos acerca da toxicidade reprodutiva do eugenol presentes na literatura indicaram embriotoxicidade *in vitro* (ID₅₀: 5,43 ± 0,72 µg/mL) após 2h de incubação por meio do teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) sobre cultura de células-tronco embrionárias (LIU et al., 2017) e *in vivo* quando incluído na dieta de camundongos na dose de 375 mg/kg + 1% de óleo de soja duas semanas antes do acasalamento e do dia 0 ao 4º dia de prenhez, acarretando em dificuldade da implantação do blastocisto no útero, aumentando a incidência de morte celular (DOMARACKÝ et al., 2007). No entanto, poucos trabalhos avaliaram o efeito dessa substância sobre as fases de pré-implantação e até o presente não foram encontrados estudos sobre organogênese de ratas Wistar e dos possíveis efeitos teratogênicos dessa substância.

Apesar dos estudos farmacológicos e toxicológicos presentes na literatura, a segurança de uso do eugenol durante a reprodução necessita de maiores informações. Nesse sentido, este trabalho avaliou os efeitos provocados pela administração oral do eugenol durante a prenhez de ratas Wistar e investigou os possíveis efeitos teratogênicos dessa substância.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo toxicológico reprodutivo do eugenol durante a prenhez de ratas Wistar.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito da administração oral do eugenol sobre os parâmetros reprodutivos de ratas Wistar nos períodos de pré-implantação (0 ao 5º dia de prenhez) e organogênese (6º ao 15º dia de prenhez);
- Avaliar os possíveis efeitos teratogênicos decorrentes da administração do eugenol durante a organogênese por meio de análises esqueléticas e viscerais dos fetos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Uso de plantas medicinais na gestação

As alterações fisiológicas necessárias para garantir a receptividade uterina e desenvolvimento fetal são mediadas por variações hormonais e ocorrem no intuito de adaptar o organismo materno à gestação (SOMA-PILLAY et al., 2016). Essas alterações incluem aumento do débito cardíaco (MELCHIORRE et al., 2016), hiperventilação (SIDDIQUI et al., 2014), maior filtração glomerular nos rins (STREVEENS et al., 2002), resistência à insulina e aumento do colesterol e triglicerídeos, alterando as frações HDL, LDL e VLDL (MANKUTA et al., 2010), entre outras. Essas alterações podem desencadear hipertensão e pré-eclâmpsia (SCHOLTEN et al., 2018), diabetes gestacional (AYACH et al., 2005), dislipidemias (FEITOSA et al., 2017) e maior susceptibilidade à formação de cálculos renais (litíase) (SANTOS et al., 2017).

As plantas medicinais produzem uma variedade de metabólitos secundários como estratégia de reprodução, defesa e proteção contra agentes bióticos ou abióticos. Esses metabólitos são fontes de princípios ativos de interesse para a farmacologia, pois desempenham diversas atividades medicinais importantes para a produção de novos medicamentos de origem natural (NIU et al., 2014), a fim de aumentar eficácia, especificidade e redução de efeitos colaterais relatados para os medicamentos tradicionais (PANDEY et al., 2011). Nesse sentido, há evidências científicas que o uso de plantas medicinais pode trazer riscos e complicações durante desenvolvimento embriofetal, podendo provocar distúrbios hormonais, retardo no crescimento intrauterino, anomalias congênitas e em casos mais extremos causar morte do indivíduo (CÂMARA et al., 2017).

Dentre os produtos naturais, os óleos essenciais são metabólitos secundários que tem o aroma e volatilidade como características marcantes e vêm sendo bastante utilizados nas indústrias farmacêuticas, alimentícia e cosmética. Esses óleos estão presentes no cotidiano das gestantes, na forma de flavorizantes alimentares, perfumes, produtos de limpeza, entre outros (BAKKALI et al., 2008).

3.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos voláteis e devido à variedade de aromas são também denominados de aromáticos ou etéreos, originados a partir do metabolismo secundário das plantas como resposta às necessidades vegetais, sejam elas estratégias de reprodução (atração de polinizadores), defesa contra predadores naturais ou alterações geofísicas e climáticas (SAMPAIO; EDRADA-EBEL; COSTA, 2016). Normalmente são líquidos, mas podem ser encontrados nas formas semissólida ou sólida à temperatura ambiente, como por exemplo, resina (BASAR; KOCH; KÖNIG, 2001) e oleoresina (MEDEIROS et al., 2018).

Os óleos aromáticos possuem coloração transparente ou levemente amarelada, com aroma marcante e sabor picante. São sensíveis à luz, temperaturas elevadas, umidade, sendo recomendado o armazenamento em recipientes escuros e hermeticamente fechados. Além disso, os óleos essenciais podem sofrer variações em sua composição de acordo com o ciclo de vida (vegetativo ou reprodutivo) da espécie, parte da planta (folhas, caule, raízes, frutos, flores, cascas, sementes), condições de temperatura e umidade (sazonalidade), qualidade do solo, localização geográfica e método de extração empregado (LIS et al., 2017).

Os óleos essenciais geralmente são constituídos por misturas complexas de compostos bioativos, que podem estar distribuídos em quantidades similares entre si ou apresentarem predominância de alguns compostos (majoritários) em relação aos outros. Esses apresentam diversas propriedades farmacológicas, exercendo atividade antioxidante (YOGALAKSHMI; VISWANATHAN; ANURADHA; 2010; GÜLÇİN, 2011), anti-inflamatória (CARDIA et al., 2018), anticâncer (POMA et al., 2018), antimicrobiana (SILVA et al., 2018). Todos esses fatores têm despertado o interesse das indústrias farmacêutica, sanitária, agrícola e alimentar, devido ao seu potencial econômico, pois são utilizados como matéria-prima de diversos produtos e insumos como as fragrâncias, flavorizantes, cosméticos, inseticidas, fitoterápicos, entre outros (BAKKALI et al., 2008).

Além disso, os óleos essenciais são utilizados na aromaterapia durante a gestação e no momento do parto como essências calmantes, analgésicas,

antieméticas e relaxantes, a exemplo das essências de rosa damascena (HAMDAMIAN et al., 2017) e lavanda (KIANPOUR et al., 2016).

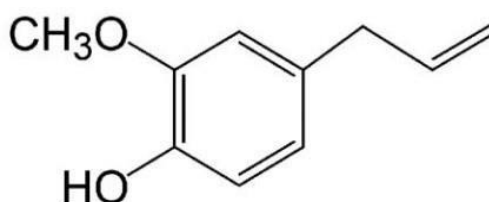
Apesar dos efeitos terapêuticos relacionados, a utilização de óleos essenciais por mulheres grávidas sem orientação médica, que procuram nas essências, alívio para os sintomas indesejáveis da gravidez (náuseas, dor de cabeça, alergias, ansiedade, depressão, insônia), pode oferecer riscos para mãe e para o feto, uma vez que substâncias terapêuticas de origem natural também podem apresentar efeitos tóxicos (SIBBRITT et al., 2014).

São exemplos de óleos essenciais não recomendados para utilização durante a gestação os óleos de alecrim, erva-doce, sálvia, jasmim, hortelã-pimenta e do cravo, cujo composto majoritário é o eugenol (SIBBRITT et al., 2014).

3.3 Eugenol

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um monoterpeneo ($C_{10}H_{12}O_2$) (Figura 1) volátil da classe dos fenilpropanoides, que se apresenta na forma líquida à temperatura ambiente e por ser um óleo apresenta densidade de 1.066 g/mL, sendo pouco solúvel em água. Além disso, possui aroma característico de cravo da Índia, coloração amarela e sabor acre. É fotossensível e muda de cor e consistência se exposto ao ar, escurecendo e tornando-se mais espesso (IARC, 1985).

Figura 1 – Estrutura química do monoterpeneo eugenol



Fonte: Adaptado de JUNG et al. (2011).

O eugenol é uma substância natural isolada do óleo essencial do cravo (*Syzygium aromaticum* L.) (SANTIN et al., 2011), podendo ser encontrado em outros gêneros e espécies vegetais, como *Cinnamomum* e *Ocimum*, que apresentam uma variedade de espécies detentoras desse fenilpropanoide, entre elas estão *C. cassia* Blume (KWON et al., 2015), *C. verum* J. Presl (MONTEIRO et al., 2017), *O. basilicum* L. (MURÁRIKOVÁ et al., 2017), *O. africanum* Lour, *O. americanum* L., *O. minimum* L. (FARAG et al., 2016), *O. gratissimum* L. (VIEIRA et al., 2001). Além desses gêneros, são relatadas outras espécies vegetais que contêm eugenol em seus óleos essenciais, tais como *Anethum graveolens* L., *Salvia officinalis* L., *Melissa officinalis* L., *Olea europaea* L., *Mentha spicata* L. (AYDOĞMUŞ et al., 2018), *Myristica fragrans* Houtt. (TALEUZZAMAN; JAHANGIR; GILANI, 2017), entre outras.

Esse fenilpropanoide é amplamente utilizado na conservação de produtos devido a suas propriedades antioxidantes e está presente nas formulações de vários produtos de uso diário como desodorantes, fio dental, perfumes, maquiagens, shampoos, produtos de limpeza e mesmo em alimentos como agente flavorizante (CHATTERJEE; BHATTACHARJEE, 2015).

Em virtude de sua ampla distribuição e utilização, o eugenol passou a ser alvo de estudos para confirmar suas atividades farmacológicas e avaliar sua capacidade de provocar efeitos tóxicos.

3.3.1 Propriedades farmacológicas do eugenol

Alguns fenilpropanoides, incluindo o eugenol, apresentam atividade antioxidante (YOGALAKSHMI; VISWANATHAN; ANURADHA, 2010; GÜLÇİN, 2011), úteis na prevenção de danos celulares causados por radicais hidroxil ($\text{HO}\cdot$), peróxido ($\text{ROO}\cdot$) e superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) e são empregados na composição de cosméticos (TAIRA et al., 1992).

A atividade antioxidante total *in vitro* foi observada a partir do poder redutor do eugenol frente a íons Fe^{3+} ($\lambda = 700 \text{ nm}$) após 20 minutos e íons Cu^{2+} ($\lambda = 450 \text{ nm}$) depois de 30 minutos de reação, nas concentrações de 15 e 45 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (GÜLÇİN, 2011). Ensaio de sequestro de radicais livres também foram realizados com o eugenol, utilizando os métodos do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), DMPD (dicloreto de N,N-dimetil-1,4-fenilenodiamônio) em comparação com os padrões BHA (hidroxianisol butilado), BHT (hidroxitolueno butilado), α -tocoferol e trolox.

A concentração de sequestro de 50% dos radicais livres (IC_{50}) do eugenol (IC_{50} : 16,06 $\mu\text{g/mL}$) foi determinada após 30 minutos de reação com radicais DPPH ($\lambda = 517 \text{ nm}$) e comparada com BHA (IC_{50} : 25,5 $\mu\text{g/mL}$), BHT (IC_{50} : 34,0 $\mu\text{g/mL}$), α -tocoferol (IC_{50} : 33,8 $\mu\text{g/mL}$) e trolox (IC_{50} : 86,9 $\mu\text{g/mL}$). A leitura da atividade de sequestro de radicais ABTS ($\lambda = 734 \text{ nm}$) foi realizada após 30 minutos de reação com o eugenol (IC_{50} : 7,84 $\mu\text{g/mL}$) ou com os padrões BHA (IC_{50} : 4,7 $\mu\text{g/mL}$), BHT (IC_{50} : 9,1 $\mu\text{g/mL}$), α -tocoferol (IC_{50} : 18,1 $\mu\text{g/mL}$) e trolox (IC_{50} : 22,8 $\mu\text{g/mL}$) e o ensaio do DMPD ($\lambda = 505 \text{ nm}$) após 10 minutos de reação com eugenol apresentou $\text{IC}_{50} = 10,04 \mu\text{g/mL}$, em comparação com os padrões BHA (IC_{50} : 63,5 $\mu\text{g/mL}$) e trolox (IC_{50} : 14,9 $\mu\text{g/mL}$) (GÜLÇİN, 2011), indicando que o eugenol exerce atividade antioxidante *in vitro* por várias metodologias.

A partir do efeito antioxidante, o pré-tratamento com eugenol foi realizado na dose de 30 μL em 0,2 mL de acetona a 15% (v/v) por via tópica administrado uma semana antes do processo de iniciação tumoral em camundongos e novamente 1h

antes da indução de tumor por meio da aplicação tópica de 7, 12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) (160 nmol em 0,2 mL de acetona) a fim de avaliar o efeito do eugenol sobre processo de iniciação tumoral. Uma semana depois os animais receberam administração por via tópica do eugenol (30 µL) 30 minutos antes do início das aplicações tópicas de 8,5 nmol de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) em 0,2 mL de acetona, para avaliar o efeito do eugenol sobre o estágio de promoção tumoral. Após aplicação do DMBA, o tratamento tópico com eugenol (30 µL/mL) continuou duas vezes por semana durante 28 semanas. Assim, o pré-tratamento com eugenol foi capaz de retardar a incidência tumoral até a 8ª semana durante o estágio de iniciação e 14ª semana no estágio de promoção tumoral. Além disso, aumentou os níveis das enzimas antioxidantes glutathiona reduzida (GSH), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) em 61, 98 e 36% respectivamente e inibiu a expressão das enzimas ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase (iNOS) na concentração de 30 µL após 6h de reação com TPA em Western Blot (KAUR; ATHAR; ALAM, 2010).

Apesar da atividade antioxidante bem estabelecida (YOGALAKSHMI; VISWANATHAN; ANURADHA; 2010; GÜLÇİN, 2011), o eugenol pode se comportar como pró-oxidante em baixas concentrações (5–10 µM) e é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio, enquanto que em altas concentrações (500 µM) atua como antioxidante (ATSUMI; FUJISAWA; TONOSAKI, 2005). Essa atividade de oxidação do eugenol pode ser influenciada pelas condições de pH, luz, oxigênio e enzimas (ATSUMI; FUJISAWA; TONOSAKI, 2005).

Durante o processo inflamatório, a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) desempenha um papel fundamental, recrutando prostaglandinas pro-inflamatórias como as prostaglandinas E2, que estão relacionadas com a modulação da inflamação pelo sistema imunológico e nos processos de angiogênese e indução de metástases tumorais (SORDELLI et al., 2012). Nesse aspecto, compostos bioativos têm sido estudados em busca de agentes inibidores específicos de COX-2, para sua utilização como anti-inflamatórios (CHAN, 2004).

Assim, o pré-tratamento do eugenol (10,7 mg/kg) por via oral durante 15 dias no modelo de indução hepática por tioacetamida (300 mg/kg) por via intraperitoneal reduziu a expressão de ciclooxigenase (COX-2), estresse oxidativo e danos ao DNA de ratos Wistar, atuando como antioxidante e anti-inflamatório (YOGALAKSHMI; VISWANATHAN; ANURADHA, 2010). De modo semelhante, o eugenol na

concentração de 50 μM inibiu a expressão de COX-2 (IC_{50} : 2,7 μM) após 9h de tratamento e prostaglandinas E2 (IC_{50} : 0,37 μM) após 16h de tratamento em macrófagos de camundongo (KIM et al., 2003), mas em comparação com o trabalho realizado por Okada et al. (2005), que avaliaram a inibição de COX-2 por Northern Blot, o eugenol (500 μM) não foi capaz de inibir a indução de COX-2 por lipopolissacarídeos (LPS), provavelmente devido a seu comportamento pró-oxidante, ressaltando o comportamento dual do eugenol que apresenta atividade antioxidante ou pró-oxidante dependendo das condições e concentrações utilizadas. Apesar disso, o eugenol parece desempenhar suas atividades anti-inflamatória e antiproliferativa inibindo a expressão de COX-2.

Ainda nessa perspectiva, Santin et al. (2011) estudaram o efeito do eugenol a partir de vários modelos de indução de úlcera gástrica em ratos Wistar. No modelo de úlcera induzida por etanol, o eugenol foi administrado por via oral nas doses de 50, 100 e 250 mg/kg + tween 80 à 1%, uma hora depois foi realizada a indução de úlcera a partir da administração de 1 mL de etanol nos animais pré-tratados e foram observadas reduções de 72 e 95% nas doses de 100 e 250 mg/kg, respectivamente, no índice de lesões gástricas em animais tratados com eugenol. No modelo de úlcera induzida por indometacina (100 mg/kg v.o.) por 4h, os animais foram pré-tratados com eugenol (50, 100 e 250 mg/kg) uma hora antes da administração da indometacina e houve redução de 36, 53 e 73% no índice de lesões ulcerativas nas doses de 50, 100 e 250 mg/kg, respectivamente. O modelo de ligadura do piloro foi realizado para avaliar o conteúdo de secreção e produção de muco gástrico e, imediatamente após ligadura do piloro, os animais receberam eugenol (50, 100 e 250 mg/kg) por via intraduodenal e foram eutanasiados após 4 horas da administração, revelando aumento de 10 e 16% respectivamente nas doses de 100 e 250 mg/kg na produção de muco em animais tratados. Estes resultados indicam atividades anti-inflamatória e antiulcerogênica por estímulo do aumento da secreção de muco gástrico.

O estudo do efeito preventivo do eugenol (50 mg/kg) por via oral durante sete dias sobre modelo de indução de infarto do miocárdio em ratos pela administração por via subcutânea de isoproterenol (100 mg/kg) por dois dias seguidos indicou que o pré-tratamento com esse óleo essencial foi capaz de minimizar os efeitos deletérios ocasionados pelo isoproterenol e promover aumento das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD : $7,80 \pm 0,52$ U/mg de proteína) e

glutathione peroxidase (GPx: $4,56 \pm 0,17$ μ moles de GSH oxidada/mg de proteína) em relação aos níveis de SOD: $5,87 \pm 0,14$ U/mg de proteína) e (GPx: $2,20 \pm 0,2$ μ moles de GSH oxidada/mg de proteína) dos animais tratados com isoproterenol, além de reduzir em 41% a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), relacionada com o agravamento de infartos, nos rins desses animais (MNAFGUI et al., 2015). Nessa mesma perspectiva, foi sugerido que o eugenol se comportava de forma antagônica ao íon cálcio, inibindo as contrações dos vasos de anéis de aorta de ratos, promovendo vasodilatação (DAMIANI; ROSSONI; VASSALLO, 2003).

A atividade ansiolítica do eugenol foi confirmada após 30 minutos da administração oral desse óleo essencial na dose de 5 mg/kg por meio do teste comportamental de labirinto de cruz elevada durante 6 minutos. Os animais tratados com eugenol (5 mg/kg) levaram $53,3 \pm 8,7$ segundos para percorrer o braço aberto do labirinto, enquanto o grupo controle recebeu 1 mg/kg de diazepam e levou $31,0 \pm 5,8$ segundos para realizar a mesma atividade (WANG et al., 2017). Outros estudos, indicam que o eugenol possui atividade antinociceptiva (BÓ et al., 2013), neuroprotetora (PRASAD; MURALIDHARA, 2013; SAID; RABO, 2017), anti-helmíntica (ASHA et al., 2001), inseticida (ENAN, 2001), antimicrobiana (SILVA et al., 2018) e também atividade antiestrogênica, ao competir com o estradiol por receptores hormonais do tipo ER α e ER β (HOWES et al., 2002).

3.3.2 Estudos toxicológicos do eugenol

Devido a sua ampla utilização e importância farmacológica, o eugenol tem sido estudado quanto a sua toxicidade, a fim de determinar uma dose segura de uso. Em 1950, a dose letal capaz de causar morte em 50% dos animais (DL₅₀) por via oral foi estimada em 1930 mg/kg e resultou em edema pulmonar, lesões renais, hepáticas e dormência nos membros inferiores dos ratos (SOBER, H.; HOLLANDER; SOBER, E., 1950). Alguns anos depois, Lavoie et al. (1986) estimaram a DL₅₀ por via intratecal do eugenol em solução de emulphor EL-620 diluído em NaCl à 10% em ratos (DL₅₀ = 11 mg/kg) e hamsters (DL₅₀ = 17 mg/kg), que exibiram também sinais de toxicidade nos pulmões, revelando pontos hemorrágicos, edema pulmonar, broncopneumonia e enfisema pulmonar agudo.

A fim de entender como o eugenol era metabolizado pelo organismo, Thompson; Constantin-Teodosiu; Moldéus (1991) relataram que a metabolização

ocorria no citocromo P450, presente em hepatócitos isolados de ratos e identificaram a formação de um metabólito intermediário tóxico, posteriormente denominado de quinona metide. Adicionalmente, McDonald; Heffner (1991) administraram eugenol (0,1 mM) por via intravenosa em coelhos e relataram aumento na formação de edema, associando a toxicidade pulmonar com um mecanismo dependente de oxidação, semelhante ao previamente proposto por Thompson; Constantin-Teodosiu; Moldéus (1991).

Além da toxicidade aguda, outros estudos foram realizados para avaliar os possíveis efeitos tóxicos causados pela administração em doses repetidas do eugenol. Hagan et al. (1965) mostraram em roedores que a administração diária do eugenol por via oral nas doses de 1400 a 4000 mg/kg durante um período de 34 dias promoveu alterações no fígado e adrenais dos animais tratados, enquanto as doses de 2000 e 4000 mg/kg resultaram na morte de alguns animais. Soundran et al. (1994) verificaram que a administração intramuscular do eugenol nas doses de 20 e 30 µg/100g de massa corporal em ratos Wistar machos durante 10 dias produziram elevações de 22 e 71% dos níveis de fosfatase alcalina. Essas mesmas doses induziram aumento dos níveis das enzimas hepáticas de 23 e 99%, respectivamente, para alanina aminotransferase e 55 e 92% para aspartato aminotransferase, quando comparadas ao grupo controle, evidenciando efeito hepatotóxico. Além disso, sapos africanos (*Xenopus laevis*) foram expostos ao eugenol (375 µL/L) por banho de imersão durante 24 horas e apresentaram lesões nos rins, enquanto que animais expostos durante 72 horas tiveram efeitos mais pronunciados no fígado e pulmões. No entanto, com a interrupção da exposição por duas semanas consecutivas, as lesões foram reversíveis, indicando que o uso prolongado do eugenol pode ser tóxico para o organismo (GOULET; VACHON; HÉLIE, 2011).

Kasugai; Hasegawa; Ogura (1990) verificaram a citotoxicidade do eugenol por meio do teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) e observaram que a concentração de 2 mM do eugenol após 4 h de incubação foi capaz de inibir completamente a formação de cristais de formazana, induzindo apoptose celular.

A partir do ensaio realizado com células-tronco embrionárias, o eugenol foi capaz de inibir a diferenciação de células mES-D3, mesmo em baixas concentrações (ID₅₀: 5,43 ± 0,72 µg/ml) após 2h de incubação por meio do teste do

MTT, indicando efeito embriotóxico *in vitro* (LIU et al., 2017). A inclusão de eugenol (375 mg/kg + óleo de soja à 1%) duas semanas antes do acasalamento e diariamente durante o período de pré-implantação (D₀ a D₄ de prenhez) na dieta de camundongos, resultou em dificuldade de implantação do blastocisto no útero, reduzindo o número de núcleos celulares e aumentando a incidência de morte celular (DOMARACKÝ et al., 2007).

Diante disso, o eugenol durante período reprodutivo foi pouco estudado e seus efeitos indicam ação tóxica para embriões e fetos, porém não foram avaliados os índices reprodutivos e teratogenicidade durante período de organogênese. No entanto, é importante compreender como esse óleo essencial pode interferir durante as fases de formação e maturação de órgãos, lactação e comportamento neuromotor dos fetos, a fim de complementar os estudos toxicológicos reprodutivos e estabelecer a segurança de uso desse composto.

3.4 Estudos toxicológicos reprodutivos pré-clínicos com ratos Wistar

Os estudos toxicológicos reprodutivos pré-clínicos, podem ser realizados em machos ou fêmeas, para prever efeitos tóxicos de uma substância sobre o comportamento de cópula e fertilidade dos animais (antes ou após acasalamento), durante período gestacional (pré-implantação, organogênese, fetal), no pós-parto, durante a lactação, ao longo de desenvolvimento neuromotor dos filhotes até a maturação sexual (OECD, 2015). Esses estudos devem ser conduzidos respeitando-se as condições de climatização e ciclo reprodutivo dos animais, que devem ter atingido no caso de ratos, a maturação sexual (em torno de 2 e 3 meses de idade); as fêmeas devem apresentar ciclos estrais regulares e devem ser acasaladas durante fase escura do ciclo ambiental, que consiste de um turno de 12h com luz artificial e outras 12h em total escuro, a fim de preservar a fisiologia natural dos animais e reduzir estresses externos para garantir a confiabilidade dos experimentos (OECD, 2015).

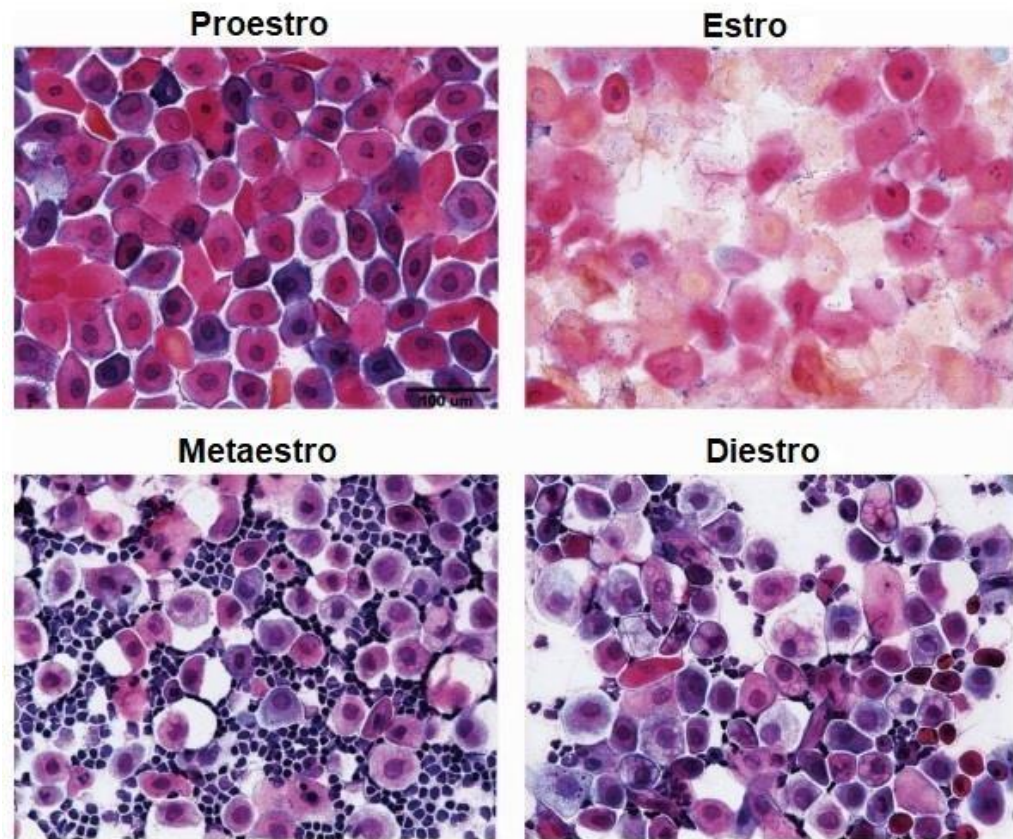
Para iniciar uma pesquisa acerca dos indicadores reprodutivos, é importante escolher a espécie animal apropriada e suas características reprodutivas, bem como definir qual delineamento experimental deve ser adotado. Diante disso, a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) – Guideline 421,

para teste de toxicidade reprodutiva recomenda o uso de pelo menos uma espécie de roedor. Assim, é comum a utilização de ratos, por possuírem facilidade de manuseio, por ter um curto período reprodutivo (20 a 22 dias), com elevado número de filhotes. Assim como na mulher, o rato possui útero com dois cornos uterinos e a placenta é do tipo hemocorial, onde o sangue permanece em contato direto com o córion (uma das membranas que compõem o saco amniótico) e os principais hormônios envolvidos nas modificações endometriais para implantação do blastocisto e manutenção da gestação são o estrogênio e a progesterona (HOLLENBACH, 2008).

A espécie *Rattus norvegicus* é considerada um bom modelo para estudos toxicológicos reprodutivos e já foi estudada quanto ao comportamento de acasalamento, parâmetros espermáticos (NANTIA et al., 2018), alterações morfológicas e/ou anatômicas dos órgãos, bem como alterações durante desenvolvimento gestacional e/ou do ciclo estral, maturação sexual e desenvolvimento neuromotor de filhotes (LOURENÇO et al., 2009; ROCHA et al., 2018).

O ciclo estral da rata é rápido, durando em torno de quatro a cinco dias e é dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro (Figura 2), que podem ser diferenciadas entre si por meio da observação do padrão celular que apresentam, a partir da análise de lavado vaginal em microscopia óptica (HOLLENBACH, 2008).

Figura 2 – As quatro fases do ciclo estral de ratas Wistar

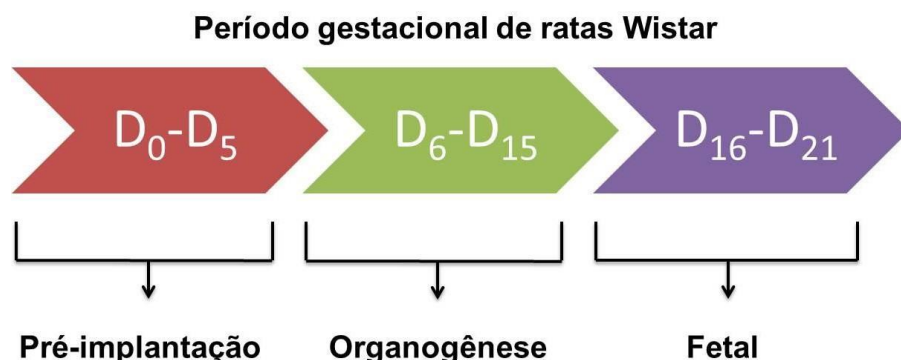


Fonte: Adaptado de HUBSCHER; BROOKS; JOHNSON (2005).

O proestro tem duração de 12h e apresenta inúmeras células granulares e nucleadas. Em seguida, ocorre a fase estro, na qual há presença de poucas células queratinizadas e anucleadas, com duração de 14h. Posteriormente, tem-se início a fase de metaestro, cujas células são pavimentosas e pouco numerosas, durando em torno de 12h. A última fase do ciclo é o diestro que se estende por 57h e tem como característica células epiteliais e uma infinidade de leucócitos (EKAMBARAM; KUMAR; JOSEPH, 2017; GOLDMAN; MURR; COOPER et al., 2007). Essa regularidade de ciclo permite prever o período do estro, no qual a rata torna-se receptiva para cópula e após acasalamento é possível detectar a prenhez ao microscópio óptico a partir da observação da presença de espermatozoides associados à fase estro do ciclo estral das ratas.

A gestação das ratas tem duração de aproximadamente 20-21 dias e pode ser dividida em três fases: pré-implantação, que compreende o intervalo entre o dia 0 e dia 5 de prenhez, organogênese, cujo período se estende do dia 6 a 15 de prenhez e o período fetal, que ocorre do dia 16 a 21 da prenhez de ratas (Figura 3).

Figura 3 – Esquema representativo do período gestacional de ratas Wistar



Fonte: Arquivo pessoal

A fase de pré-implantação é caracterizada por um período de intenso processo de diferenciação celular, mediado por modificações hormonais e estruturais para garantir a implantação do blastocisto ao útero. A diferenciação do blastocisto implantado dará origem ao embrião e nessa fase começam a ocorrer modificações no organismo materno, como a formação dos corpos lúteos, estruturas responsáveis pela secreção de progesterona nos ovários para inibir a descamação do endométrio e sustentar a gestação, além de modificar o aporte sanguíneo materno de modo a atender as necessidades do desenvolvimento embrionário (MEYER; BRUCE, 1979).

Desta forma, distúrbios ocasionados por xenobióticos nesta fase da gestação podem dificultar ou comprometer a implantação do embrião ao útero, ocasionando obstrução das tubas uterinas, interrupção do suprimento de estrogênio, desequilíbrio hormonal entre progesterona e estrogênio, atraso no transporte ou expulsão do blastocisto do útero (JADARAMKUNTI; KALIWAL, 2001), acarretando em perdas pré- ou pós-implantação ou ainda em reabsorções (YAKUBU; BUKOYE, 2009). Esses distúrbios durante a pré-implantação indicam efeito embriotóxico da substância, que deve ser evitada durante o desenvolvimento embrionário.

O período posterior à implantação do blastocisto no útero é denominado de organogênese, caracterizado por uma série de etapas de migração e diferenciação celular para originar os órgãos e tecidos primários do feto, que serão maturados ao longo do desenvolvimento fetal e pós-natal até a maturação sexual dos filhotes (LIMA, 2014). Esta fase é, portanto, considerada crítica e sensível à ação de xenobióticos, que podem prejudicar a performance reprodutiva materna, levando à

distúrbios comportamentais, fisiológicos e nutricionais e trazer consequências para o feto, tais como retardo no desenvolvimento intrauterino, aumento da frequência de malformações congênitas e interferência na diferenciação sexual dos animais, podendo levar o feto à morte (BRENT, 1993).

Os teratógenos de forma geral são agentes externos ao organismo como xenobióticos, fatores químicos, físicos, biológicos, ou ambientais capazes de interferir negativamente no desenvolvimento embriofetal. Além disso, fatores genéticos, como falhas no emparelhamento cromossômico, também podem causar efeitos teratogênicos, como as malformações congênitas. Dessa forma, o efeito teratogênico pode ser unifatorial, quando apenas um agente causa as malformações, ou multifatorial, quando dois tipos ou mais de fatores causam a deformação no organismo fetal (DÍAZ; POWELL; JANSSON, 2014).

Em estudos teratológicos, modificações estruturais podem ser classificadas em malformações (ausências anormais, alta gravidade) ou variações (faltas normais, baixa gravidade) de acordo com a severidade com que são manifestadas nos portadores dessas condições. Malformações são modificações físicas, que podem ser consideradas permanentes e passíveis de prejudicar a saúde pós-natal dos portadores. Assim, ausência, fusão ou deformação de estruturas ósseas ou viscerais são classificadas como malformações. No entanto, as alterações físicas com ocorrência natural ou pouco frequentes, são classificadas como variações e não representam maiores riscos pós-natal para os portadores (SOLECKI et al., 2001). Assim, distúrbios severos como as malformações podem indicar efeito teratogênico de uma determinada substância sobre o organismo fetal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas com 2-3 meses de idade (200 – 250 g), provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro), temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e receberam água e ração (Presença, Campinas, Brasil) *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Utilização Animal (CEUA) da UFPE sob processo de nº 0041/2017 (Anexo A). O estudo seguiu as diretrizes da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) – Guideline 421, para teste de toxicidade reprodutiva (OECD, 2015).

4.2 Reagentes

Para realização deste trabalho foram utilizados como reagentes: eugenol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) com 99% de pureza, tween 80 P.S. polissorbato (Dinâmica Química Contemporânea Ltda) como veículo e água destilada como solvente. Para as análises visceral e esquelética foram utilizados: acetona 99,62% de pureza (Casa do Laboratório), ácido acético glacial P.A. (Química moderna), álcool etílico 95% P.A. (Química Moderna), alizarina sódica P.A. (Dinâmica Química Contemporânea Ltda), formaldeído 37% P.A. (Neon Comercial Ltda), glicerina bidestilada pura (Tec-Lab), hidróxido de potássio (KOH) P.A. (Dinâmica Química Contemporânea Ltda) e como anestésico empregado para realizar a cesariana das fêmeas foi utilizado o isoflurano.

4.3 Acasalamento

O acasalamento foi realizado durante a fase escura do ciclo ambiental dos animais, fêmeas nulíparas foram colocadas em contato com machos adultos na

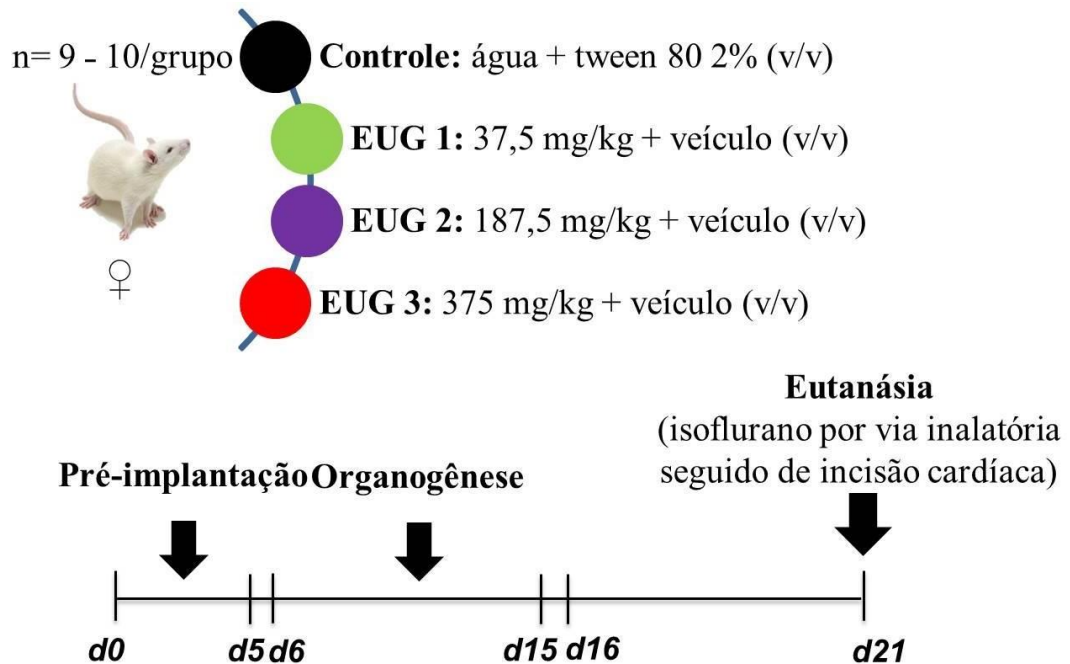
proporção de 1:1 (OECD, 2015). No dia seguinte, os machos foram retirados das gaiolas e as fêmeas foram, cuidadosamente, imobilizadas para realização da coleta de lavado vaginal com solução de NaCl à 0,9%. Essa solução foi introduzida na abertura do canal vaginal das ratas com auxílio de uma ponteira acoplada a uma tetina de silicone, criando uma estrutura semelhante a um conta-gotas. O lavado vaginal coletado foi depositado em lâminas de vidro para análise em microscopia óptica. A observação de espermatozoides nas lâminas, associado a células da fase estro do ciclo estral das ratas, caracterizou a cópula e determinou o dia 0 de prenhez (D₀) (COOPER; GOLDMAN; VANDENBERGH, 1993).

4.4 Grupos experimentais e doses utilizadas

Após a identificação da prenhez, as ratas foram aleatoriamente divididas em oito grupos experimentais (n=9-10/grupo), dos quais quatro grupos foram tratados apenas durante a fase de pré-implantação (0^o ao 5^o dia de prenhez) e os outros quatro apenas durante a organogênese (6^o ao 15^o dia de prenhez). Os grupos experimentais receberam administração de 5 mL/kg por gavagem (via oral) do veículo (água + tween 80 à 2%) ou eugenol (EUG) + veículo diariamente as 8 h da manhã. As doses empregadas neste trabalho e descritas abaixo foram baseadas em estudo em andamento realizado no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Bioativos da UFPE.

O primeiro grupo (n=9) foi considerado como controle e recebeu apenas o veículo (água + tween 80 à 2%), enquanto os outros três grupos receberam o eugenol + veículo, nas doses de 37,5 (EUG 1), 187,5 (EUG 2) e 375 mg/kg/dia (EUG 3) (Figura 4).

Figura 4 – Esquema representativo da distribuição e doses utilizadas por grupo durante as fases de pré-implantação e organogênese de ratas Wistar e método de eutanásia dos animais.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.5 Análise da toxicidade materna

Durante todo período gestacional, as progenitoras foram observadas diariamente quanto a possíveis alterações de comportamento, sobrevivência, consumo de água e ração, piloereção, diarreia e sangramento vaginal. Além disso, foi registrado o ganho de massa das progenitoras em dias alternados, visando minimizar o estresse provocado pela manipulação dos animais, conforme orientado pela OECD 421 (OECD, 2015).

4.6 Avaliação da performance reprodutiva materna

No 21º dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas conforme Diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2015) em câmara fechada contendo gaze embebida em 10 gotas de isoflurano por via inalatória até que o animal apresentasse sinais clínicos de anestesia geral como ausência de movimentos ou sensibilidade nas patas e cauda, laparotomizadas e eutanasiadas por incisão cardíaca. Assim, os ovários

(direito e esquerdo) foram removidos e pesados e foi registrado o número de corpos lúteo. Em seguida, os cornos uterinos foram removidos, pesados e expostos para observação e contagem do número de fetos nascidos vivos ou mortos, número de sítios de implantação e de reabsorções (precoces e tardias). As massas absolutas dos fetos, placentas e demais órgãos maternos (timo, coração, pulmões, fígado, rins, adrenais, estômago, pâncreas e baço) foram aferidos e examinados quanto à presença de malformações macroscópicas e foram determinadas a relação materno fetal, massa relativa dos órgãos maternos e taxas reprodutivas de implantação, perda pré e pós-implantação e também a taxa de reabsorção de acordo com prévios trabalhos do laboratório (Costa-Silva et al., 2007), que foram detalhadas abaixo:

Relação materno fetal:

$$\frac{\text{massa da ninhada (g)}}{\text{massa da progenitora (g)}}$$

Massa relativa dos órgãos maternos:

$$\frac{\text{massa do órgão (g)}}{\text{massa da progenitora (g)}} \times 100$$

As taxas reprodutivas foram expressas em porcentagem (%) e foram calculadas conforme equações abaixo:

Taxas de implantação:

$$\frac{\text{número de implantações}}{\text{número de corpos lúteo}} \times 100$$

Taxa de perda pré-implantação:

$$\frac{\text{número de corpos lúteo} - \text{número de sítios de implantação viáveis}}{\text{número de corpos lúteo}} \times 100$$

Taxa de perda pós-implantação:

$$\frac{\text{número de sítios de implantação} - \text{número de fetos vivos}}{\text{número de sítios de implantação}} \times 100$$

Taxa de reabsorção:

$$\frac{\text{número de sítios de reabsorção}}{\text{número de sítios de implantação}} \times 100$$

4.6.1 Avaliação da embriofetotoxicidade

Este procedimento foi realizado para os fetos das duas fases gestacionais (pré-implantação e organogênese) avaliadas neste trabalho. Após a histerectomia, os recém-nascidos foram sexados por meio da distância anogenital (distância entre o centro do ânus e o centro da prega genital), na qual fêmeas apresentam distância anogenital menor que os machos. Posteriormente, os fetos e as placentas viáveis foram pesados, separadamente e foram calculados a razão sexual e o índice placentário.

Para efeito de cálculo, as ninhadas foram consideradas como unidade experimental nas fórmulas abaixo:

Razão sexual:

$$\frac{\text{número de fetos machos}}{\text{número de fetos fêmeas}}$$

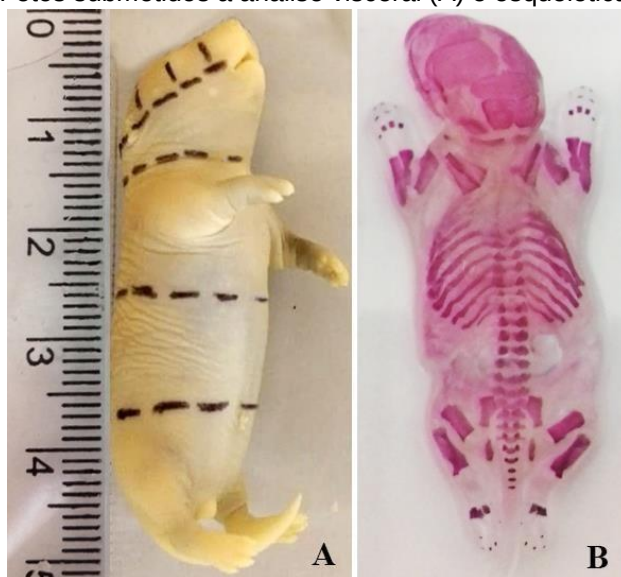
Índice placentário:

$$\frac{\text{massa das placentas viáveis (g)}}{\text{massa da ninhada (g)}} \times 100$$

4.6.2 Análise das alterações e/ou malformações fetais na organogênese

As análises das alterações e/ou malformações fetais foram realizadas apenas nos fetos das fêmeas tratadas durante o período de organogênese (D₆ a D₁₅), para identificar possíveis efeitos teratogênicos do eugenol e foram subdivididas em análises minuciosas da estrutura esquelética e visceral dos fetos (Figura 5).

Figura 5 – Fetos submetidos à análise visceral (A) e esquelética (B).



Fonte: Arquivo pessoal.

4.6.2.1 Análise visceral

O exame visceral é uma análise detalhada das secções da cabeça, tórax e pelve, este estudo foi conduzido de acordo com o método de secção seriada de Wilson (1965). Após a análise externa, os fetos foram acomodados em placas de petri e mantidos à temperatura de -20° C durante 20 minutos para serem anestesiados por hipotermia, conforme recomendações do Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais (BRASÍLIA, 2013). Metade de cada ninhada foi fixada em solução de Boudian, composta pela mistura de 50 mL de formaldeído, 50 mL de ácido acético, 752 mL de álcool etílico 95% e 148 mL de água destilada, por no mínimo uma semana para subsequente exame visceral. Após processo de fixação, os fetos foram seccionados com auxílio de uma lâmina de bisturi n° 11, conforme tracejado da figura 1-A. As análises foram realizadas na cabeça, observando o palato, ouvidos internos, medula, traqueia, cavidade e septo nasal,

bulbo olfatório, retina, córnea e cristalino, além do hemisfério cerebral, ventrículos e diencéfalo. Na sequência foram realizados cortes transversais na cavidade torácica, abdominal e pélvica, observando a morfologia e posição anatômica dos órgãos fetais.

4.6.2.2 Análise esquelética

Para a investigação das alterações esqueléticas, a outra metade da ninhada foi corada com vermelho de alizarina seguindo protocolo adaptado de Staples; Schenell (1964). Os fetos foram anestesiados por hipotermia e com auxílio de uma lâmina de bisturi foi realizado um corte horizontal abaixo da região das costelas, em seguida, os fetos foram imersos em acetona por 24h, para fixação dos órgãos e tecidos. No dia seguinte, os fetos foram cuidadosamente eviscerados com auxílio de um descolador de ponta em concha redonda, para evitar danos à estrutura esquelética e transferidos para uma solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH à 1%) por 24h, esse procedimento foi realizado para a diafanização dos tecidos. Posteriormente, foi iniciado o processo de coloração dos ossos com solução de vermelho de alizarina (0,50 mg) + KOH à 1% (200 mL), que consistiu no processo de trocas sucessivas da solução a cada 24h. Após quatro dias de coloração, os fetos foram armazenados em glicerina até o momento das análises. Esse procedimento permite que os tecidos sejam clareados e a interação da alizarina com os tecidos fetais promova coloração nas regiões com deposição de cálcio, permitindo que os ossos sejam visualizados com coloração vermelho-arroxeadada (Figura 5-B).

No momento da análise óssea, o excesso de cartilagem presente na região cervical dos fetos foi cuidadosamente removido com auxílio de bisturi e pinça, para exposição das vértebras cervicais. Assim, foram avaliados o número, forma e localização dos ossos para confirmação de alterações e/ou malformações fetais, segundo critérios propostos por Solecki (2001). A contagem e análise dos pontos de ossificação foram realizadas na parte lateral e superior do crânio (pré-maxilar, maxilar, zigomático, escamoso, exoccipital, nasal, frontal, parietal, interparietal, supraoccipital), esterno (manúbrio, centros externos e processo xifoide), costelas, membros superiores (clavícula, escápula, úmero, ulna, radio, metacarpos e falanges) e inferiores (cristas ilíacas, ísquio, púbis, fêmur, fíbula, tíbia, metatarso e

falanges) e vértebras (cervicais, torácicas, sacrais, lombares e caudais), de acordo com método de Aliverti et al. (1979).

4.7 Análises estatísticas

Para a escolha do teste estatístico a ser utilizado, as amostras foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para determinar se os dados eram paramétricos ou não paramétricos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) ou mediana, para dados não paramétricos como: taxas reprodutivas e índices placentários (%). Dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett. Para dados não paramétricos foi usado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Para análise de malformações esqueléticas e viscerais foi utilizado o teste de qui-quadrado. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) e foi aceito como estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Toxicidade materna

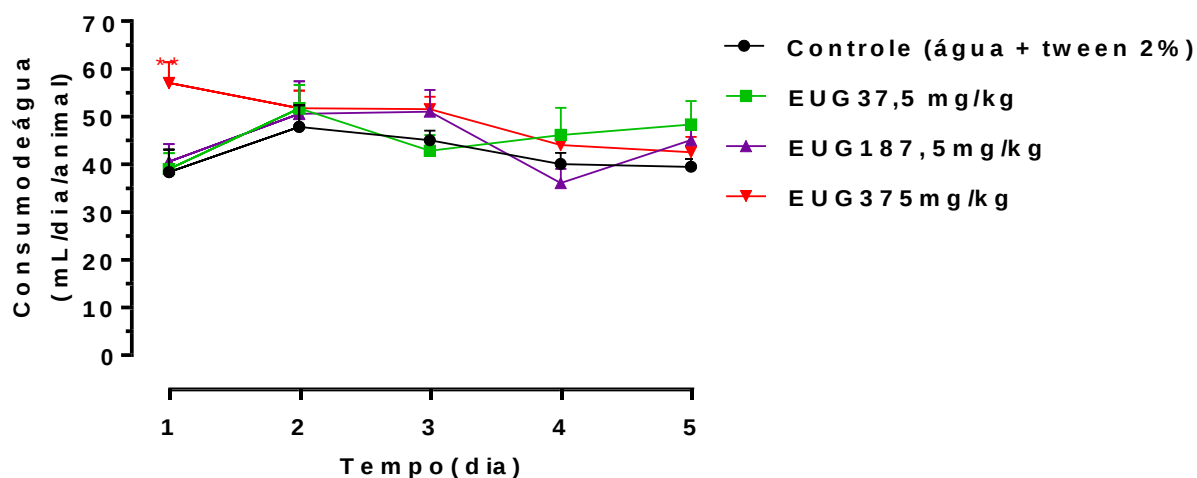
5.1.1 Sinais clínicos de toxicidade

A administração oral de eugenol nas doses de 37,5 (EUG 1); 187,5 (EUG 2) e 375 mg/kg (EUG 3) não causou óbito, alterações comportamentais ou sinais clínicos de toxicidade como piloereção, diarreia e sangramento vaginal nas progenitoras tratadas durante o período de pré-implantação (0º ao 5º dia de prenhez) nem durante a organogênese (6º ao 15º dia de prenhez).

5.1.2 Consumo de água, ração e ganho de massa materno na pré-implantação

A ingestão de água foi alterada apenas no dia 1 onde houve aumento de 48,8% no grupo EUG 3 ($57,0 \pm 4,4$ mL/dia/animal) em relação ao grupo controle ($38,3 \pm 4,7$ mL/dia/animal), conforme mostrado na figura 6.

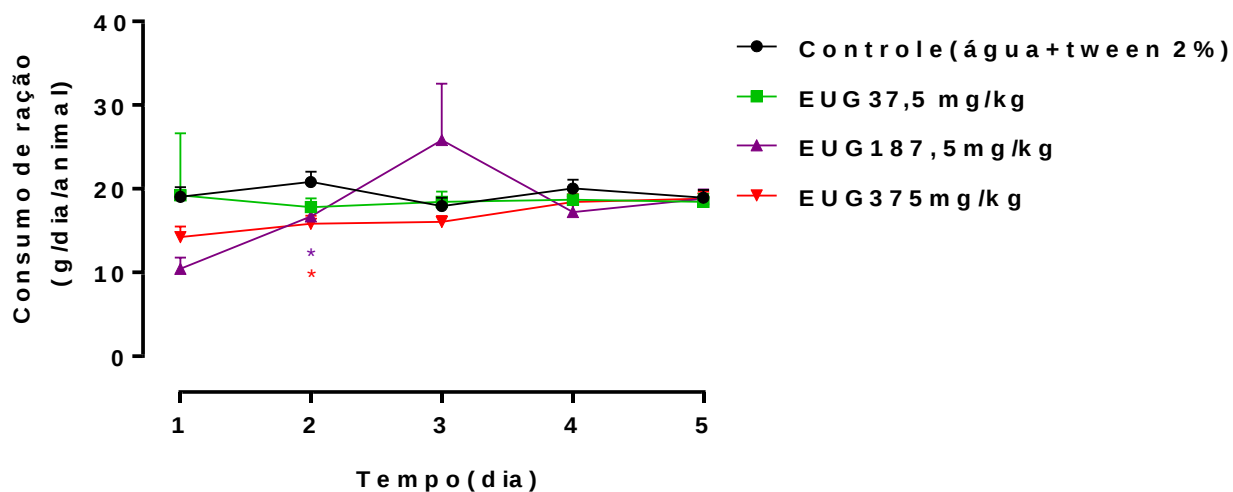
Figura 6 – Consumo de água (mL/dia/animal) de ratas prenhes durante a pré-implantação.



Efeito da administração por via oral do eugenol (EUG) nas doses de 37,5; 187,5 e 375 mg/kg no consumo de água (mL/dia/animal) durante período de pré-implantação (D₀ a D₅). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. (n=9–10/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, **p<0,01).

O consumo de ração no dia 2 foi reduzido significativamente em 19,7 e 24% respectivamente nos grupos EUG 2 ($16,7 \pm 1,3$ g/dia/animal) e EUG 3 ($15,8 \pm 1,0$ g/dia/animal) em relação ao grupo controle ($20,8 \pm 1,2$ g/dia/animal) figura 7.

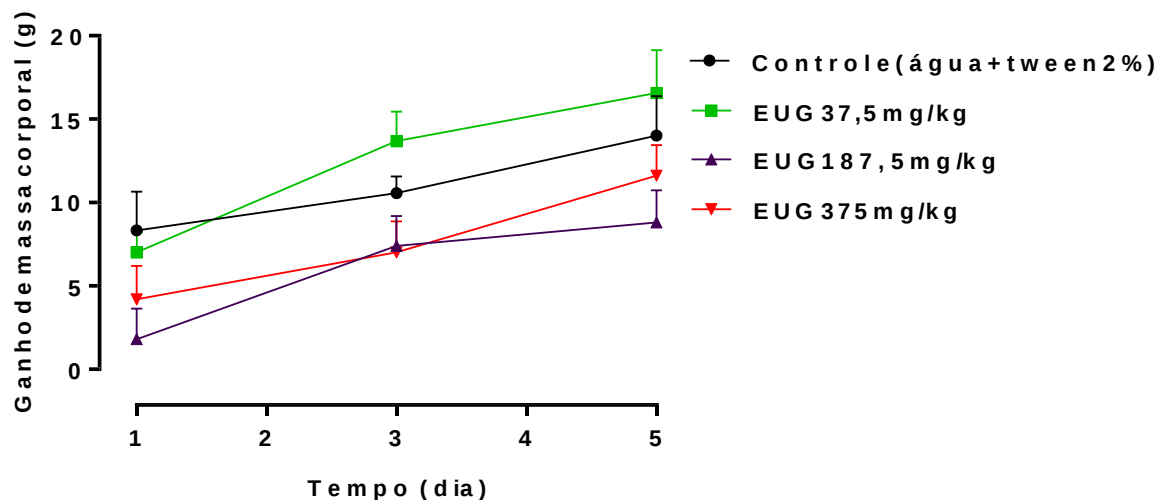
Figura 7 – Consumo de ração (g/dia/animal) de ratas prenhes durante a pré-implantação.



Efeito da administração por via oral do eugenol (EUG) nas doses de 37,5; 187,5 e 375 mg/kg no consumo de ração (g/dia/animal) durante período de pré-implantação (D₀ a D₅). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. (n=9–10/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, *p<0,05).

O ganho de massa corporal das progenitoras não foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle durante a pré-implantação (figura 8).

Figura 8 – Ganho de massa corporal (g) de ratas prenhes durante a pré-implantação.



Efeito da administração por via oral do eugenol (EUG) nas doses de 37,5; 187,5 e 375 mg/kg sobre ganho de massa corporal (g) de ratas Wistar durante período de pré-implantação (D0 a D5). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. (n=9–10/grupo).

5.1.3 Parâmetros reprodutivos na pré-implantação

Após a laparotomia, foram observadas algumas alterações morfológicas nos órgãos das progenitoras: aderência do estômago ao fígado, adrenal aderida ao rim, adrenal distante do rim, nódulos nos pulmões, formações de nódulos enrijecidos próximos a rins, pâncreas e adrenais em fêmeas tratadas durante o período de pré-implantação (Quadro 1).

Quadro 1 – Relação das alterações observadas nos órgãos maternos durante fase de pré-implantação (D₀ a D₅).

Órgãos	Controle	EUG 1	EUG 2	EUG 3
Fígado	-	-	Aderido ao estômago (1)	-
Pulmões	-	-	Nódulo e/ou edema (2)	Nódulo e/ou edema (3)
Rim	-	-	Nódulos (1)	-
Adrenal	-	-	Distante do rim (1)	Aderida ao rim com nódulos sobre e próximo ao órgão (1)
Pâncreas	-	-	Nódulos (1)	-

A relação de alterações nos órgãos maternos foi organizada de acordo com o órgão afetado e os grupos controle (água + tween 80 à 2%), EUG 1 (37,5 mg/kg), EUG 2 (187,5 mg/kg), EUG 3 (375 mg/kg). Os números entre parênteses representam a quantidade de animais portadores das alterações, enquanto que o símbolo (-) representa ausência de alterações nos órgãos.

Os parâmetros reprodutivos avaliados como massa absoluta dos ovários e das placentas, taxas de implantação, reabsorção e as taxas de perda pré e pós-implantação e índices placentários apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo controle durante a fase de pré-implantação.

A massa absoluta das placentas foi significativamente reduzida em 34,6% no grupo EUG 2 em comparação com o grupo controle. Na massa relativa das placentas ocorreu redução significativa de 97,5% nos grupos EUG 1 e EUG 2 e de 98,1% no grupo EUG 3 quando comparados ao grupo controle, maiores detalhes podem ser visualizados na tabela 1. Também houve redução significativa de 21,4 e 21,3% na massa absoluta dos ovários e pâncreas respectivamente no grupo EUG 3 quando comparados aos seus respectivos controles.

Tabela 1 – Efeito da administração oral do eugenol sobre a massa absoluta (g) e relativa (%) dos órgãos maternos durante o período de pré-implantação em ratas Wistar.

Órgãos	Controle		EUG 1 (37,5 mg/kg)		EUG 2 (187,5 mg/kg)		EUG 3 (375 mg/kg)	
	Massa (g)	Relativa (%)	Massa (g)	Relativa (%)	Massa (g)	Relativa (%)	Massa (g)	Relativa (%)
Timo	0,36 ± 0,04	0,10 ± 0,01	0,36 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,32 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,09 ± 0,01
Coração	0,96 ± 0,03	0,27 ± 0,00	0,91 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,94 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,94 ± 0,02	0,27 ± 0,01
Pulmões	1,73 ± 0,14	0,49 ± 0,04	1,59 ± 0,08	0,49 ± 0,03	1,68 ± 0,10	0,55 ± 0,03	1,82 ± 0,10	0,54 ± 0,03
Fígado	14,81 ± 0,69	4,21 ± 0,09	13,83 ± 0,47	4,26 ± 0,14	13,24 ± 0,41	4,33 ± 0,22	14,04 ± 0,51	4,10 ± 0,11
Rins	2,26 ± 0,07	0,64 ± 0,01	2,10 ± 0,05	0,65 ± 0,03	2,04 ± 0,09	0,67 ± 0,04	2,18 ± 0,06	0,64 ± 0,02
Adrenais	0,10 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Pâncreas	0,94 ± 0,06	0,27 ± 0,02	0,78 ± 0,04	0,24 ± 0,01	0,94 ± 0,06	0,31 ± 0,03	0,74 ± 0,05*	0,22 ± 0,01
Baço	0,67 ± 0,09	0,19 ± 0,02	0,72 ± 0,07	0,22 ± 0,02	0,90 ± 0,09	0,29 ± 0,02	0,95 ± 0,15	0,28 ± 0,05
Estômago	1,71 ± 0,05	0,50 ± 0,02	1,57 ± 0,06	0,48 ± 0,01	1,68 ± 0,07	0,52 ± 0,02	1,68 ± 0,03	0,49 ± 0,02
Ovários	0,14 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,11 ± 0,01**	0,03 ± 0,00
Útero gravídico	58,46 ± 4,23	16,49 ± 1,05	50,01 ± 3,49	15,39 ± 1,04	45,05 ± 3,30	13,89 ± 0,89	46,66 ± 8,43	13,30 ± 2,34
Placentas	5,72 ± 0,44	1,62 ± 0,10	5,09 ± 0,53	0,04 ± 0,00****	3,74 ± 0,40*	0,04 ± 0,00****	5,33 ± 0,60	0,03 ± 0,00****

Valores representam a média ± e.p.m. (n=9–10/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001). As massas relativas dos órgãos foram calculadas a partir da razão entre a massa do órgão e a massa da fêmea prenhe no último dia de gestação x 100.

Nas taxas reprodutivas houve redução significativa na implantação no grupo EUG 1 (85,7%) e EUG 2 (86,8%) em relação ao controle (100%). Foram aumentadas significativamente as taxas de perda pré-implantação nos grupos EUG 1 (28,6%) e EUG 2 (25%), as taxas de reabsorção no grupo EUG 3 (20,2%) e as taxas de perda pós-implantação no grupo EUG 3 (20,2%) em relação aos respectivos grupos controle (8,3%). E os índices placentários de EUG 1 (10%) e EUG 2 (15%) foram estatisticamente menores em relação ao grupo controle (20%), como mostrado na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros reprodutivos de ratas Wistar tratadas com eugenol do dia 0 a 5 da prenhez (período de pré-implantação).

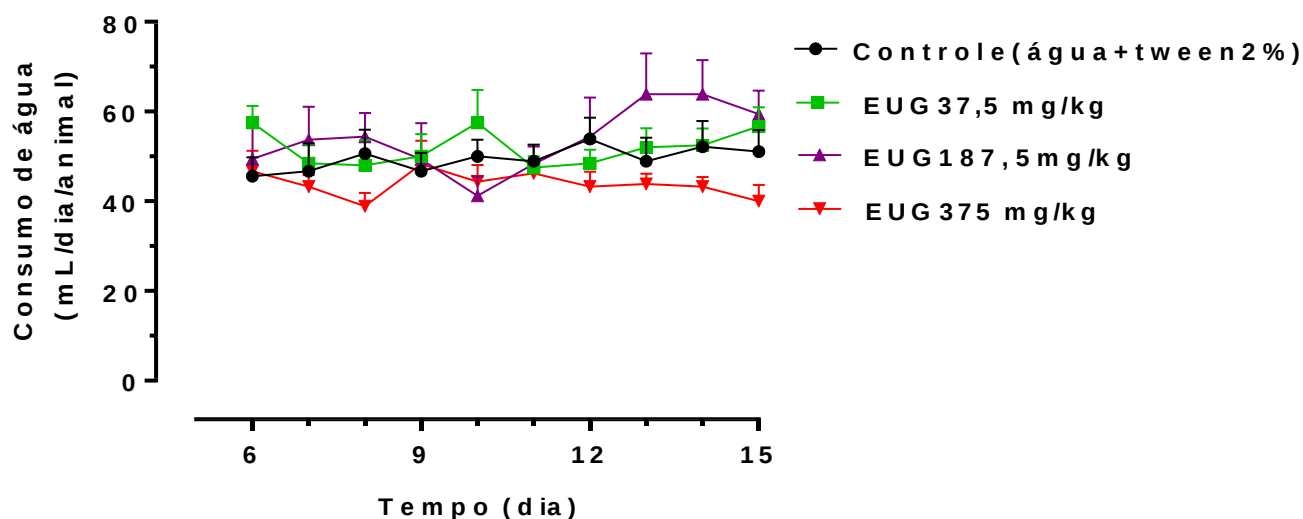
Parâmetros reprodutivos	Controle	EUG 1 (37,5 mg/kg)	EUG 2 (187,5 mg/kg)	EUG 3 (375 mg/kg)
Ratas prenhes	9	9	10	10
Ganho de massa corporal durante pré-implantação (g)^a	10,96 ± 1,65	12,41 ± 2,83	6,00 ± 2,14	7,60 ± 2,16
Ganho de massa corporal durante prenhez (g)^a	30,29 ± 6,94	38,37 ± 8,75	30,09 ± 7,93	30,36 ± 7,80
Número de fetos vivos	95	77	77	78
Número de natimortos	0	1	1	2
Relação ninhada/progenitora^a	36,58 ± 2,41	31,48 ± 2,57	26,08 ± 2,17	26,93 ± 5,31
Índice placentário (%)^b	20	10****	15**	20
Razão sexual (M/F)^c	1:1,3	1:1,2	1:1,5	1:1
Massa absoluta das placentas (g)^a	5,72 ± 0,44	5,09 ± 0,53	3,74 ± 0,40*	5,33 ± 0,60
Massa absoluta dos ovários (g)^a	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,01**
Número de sítios de implantação	102	91	94	108
Número de sítios de reabsorção	8	14	15	29
Número de corpos lúteos	12,22 ± 0,46	11,89 ± 0,73	11,30 ± 0,73	13,30 ± 0,98
Taxa de implantação (%)^b	100	85,7****	86,8**	100
Taxa de reabsorção (%)^b	8,3	16,7	4,5	20,2***
Perda pré-implantação (%)^b	8,3	28,6****	25***	20,2
Perda pós-implantação (%)^b	8,3	16,7	4,5	20,2***

Índices placentários (massa das placentas viáveis (g)/massa da ninhada (g) x 100), taxas de implantação (nº total de sítios de implantação/nº total de corpos lúteos x 100), taxas de reabsorção (nº total de sítios de reabsorção/nº total de sítios de implantação x 100), taxas de perda pré-implantação (nº de corpos lúteos – nº de sítios de implantações viáveis/ nº de corpos lúteos x 100), taxas de perda pós-implantação (nº de implantações – nº de fetos vivos/nº de implantações x 100) e a razão sexual foi determinada pelo nº total de fetos machos/nº total de fetos fêmeas. Os valores estão expressos em média ± e.p.m. ou mediana. Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett^a, Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn^b ou Teste do Qui-quadrado^c, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001).

5.1.4 Consumo de água, ração e ganho de massa materno na organogênese

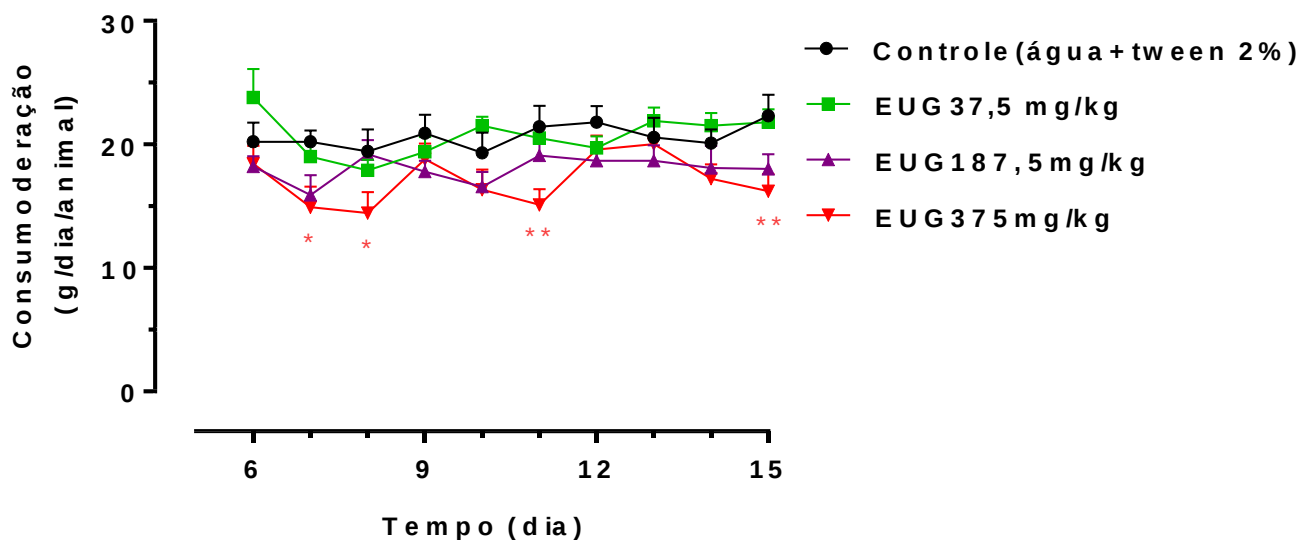
Não houve diferenças significativas na ingestão de água quando comparado ao grupo controle durante a organogênese (Figura 9).

Figura 9 – Consumo de água (mL/dia/animal) de ratas prenhes durante organogênese.



Efeito da administração por via oral do eugenol (EUG) nas doses de 37,5; 187,5 e 375 mg/kg sobre o consumo de água (mL/dia/animal) de ratas Wistar durante período de organogênese (6º a 15º dia). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. (n=9–10/grupo).

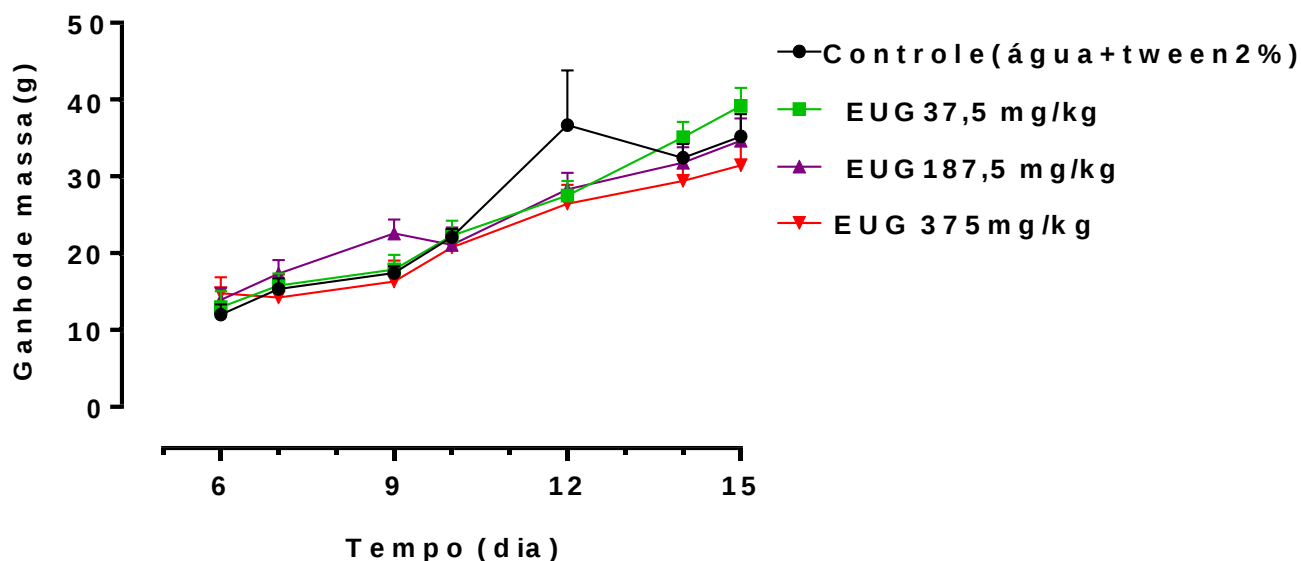
Figura 10 – Consumo de ração (g/dia/animal) de ratas prenhes durante organogênese.



Efeito da administração oral do eugenol (EUG) nas doses de 37,5; 187,5 e 375 mg/kg sobre consumo de ração (g/dia/animal) de ratas Wistar durante período de organogênese (6º a 15º dia). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. (n=9–10/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01).

No consumo de ração houve redução no grupo EUG 3 de 26,4% no dia 7 (14,89 $\pm$ 1,69 g/dia/animal) versus (C: 20,22 $\pm$ 0,92 g/dia/animal), 25,7% no dia 8 (14,44 $\pm$ 1,70 g/dia/animal) versus (C: 19,44 $\pm$ 1,78 g/dia/animal), 29,5% no dia 11 (15,11 $\pm$ 1,28 g/dia/animal) versus (C: 21,44 $\pm$ 1,69 g/dia/animal), 27,3% no dia 15 (16,22 $\pm$ 1,40 g/dia/animal) versus (C: 22,33 $\pm$ 1,72 g/dia/animal) (Figura 10). Entretanto, não houve diferença significativa no ganho de massa materno durante organogênese (Figura 11).

Figura 11 – Ganho de massa corporal (g) de ratas prenhes durante a organogênese.



Efeito da administração oral do eugenol (EUG) nas doses de 37,5; 187,5 e 375 mg/kg sobre o ganho de massa corporal (g) de ratas Wistar durante período de organogênese (6º a 15º dia). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. (n=9–10/grupo).

5.1.5 Parâmetros reprodutivos na organogênese

Após laparotomia, a análise externa dos órgãos maternos revelou a presença de nódulos enrijecidos próximos aos rins e timo em duas ratas do grupo controle e no pâncreas e adrenais (Quadro 2) em algumas ratas dos grupos experimentais.

Quadro 2 – Relação das alterações observadas nos órgãos maternos durante fase de organogênese (D₆ a D₁₅).

Órgãos	Controle	EUG 1	EUG 2	EUG 3
Fígado	-	-	-	-
Pulmões	-	-	-	-
Rim	Nódulos (2)	Nódulos (2)	Nódulos (7)	Nódulos (8)
Adrenal	-	-	-	-
Pâncreas	-	Nódulos (2)	Nódulos (1)	Nódulos (1)
Timo	Nódulos (1)	Nódulos (3)	-	Nódulos (8)

A relação de alterações nos órgãos maternos foi organizada de acordo com o órgão afetado e os grupos controle (água + tween 80 à 2%), EUG 1 (37,5 mg/kg), EUG 2 (187,5 mg/kg), EUG 3 (375 mg/kg). Os números entre parênteses representam a quantidade de animais portadores das alterações, enquanto que o símbolo (-) representa ausência de alterações nos órgãos.

Na organogênese os parâmetros reprodutivos avaliados como massa absoluta e relativa do pâncreas, taxas de implantação, reabsorção e as taxas de

perda pré e pós-implantação e índices placentários apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle.

As massas absolutas do pâncreas apresentaram redução significativa de 21 e 24% respectivamente nos grupos EUG 2 e EUG 3 em relação ao grupo controle, enquanto que as massas relativas desse órgão foram significativamente reduzidas em 16% nos grupos EUG 1 e EUG 2 e 25,8% no grupo EUG 3 quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito da administração oral do eugenol sobre a massa absoluta (g) e relativa (%) dos órgãos maternos durante o período de organogênese em ratas Wistar.

Órgãos	Controle		EUG 1 (37,5 mg/kg)		EUG 2 (187,5 mg/kg)		EUG 3 (375 mg/kg)	
	Massa (g)	Relativa (%)	Massa (g)	Relativa (%)	Massa (g)	Relativa (%)	Massa (g)	Relativa (%)
Timo	0,36 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,34 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,31 ± 0,03	0,10 ± 0,01
Coração	0,86 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,84 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,78 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,80 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Pulmões	1,39 ± 0,09	0,44 ± 0,02	1,46 ± 0,08	0,44 ± 0,02	1,33 ± 0,05	0,44 ± 0,02	1,28 ± 0,05	0,40 ± 0,01
Fígado	12,14 ± 0,48	3,83 ± 0,09	12,78 ± 0,30	3,86 ± 0,08	12,22 ± 0,75	3,97 ± 0,14	12,69 ± 0,40	3,97 ± 0,06
Rins	1,92 ± 0,09	0,61 ± 0,02	1,9 ± 0,08	0,57 ± 0,02	1,85 ± 0,08	0,61 ± 0,02	1,83 ± 0,05	0,57 ± 0,02
Adrenais	0,10 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,19 ± 0,09	0,07 ± 0,03	0,08 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Pâncreas	0,99 ± 0,08	0,31 ± 0,02	0,86 ± 0,04	0,26 ± 0,01*	0,78 ± 0,04*	0,26 ± 0,01*	0,75 ± 0,05**	0,23 ± 0,01**
Baço	0,57 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,53 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,54 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,60 ± 0,03	0,19 ± 0,01
Estômago	1,49 ± 0,06	0,47 ± 0,01	1,56 ± 0,06	0,47 ± 0,01	1,37 ± 0,11	0,45 ± 0,03	1,54 ± 0,06	0,49 ± 0,03
Ovários	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,00
Útero gravídico	59,37 ± 7,25	18,38 ± 1,85	68,32 ± 3,93	20,61 ± 1,14	59,2 ± 7,59	19,46 ± 2,46	68,25 ± 6,94	20,97 ± 1,56
Placentas	4,93 ± 0,66	1,53 ± 0,17	5,17 ± 0,35	1,56 ± 0,10	5,05 ± 0,19	1,66 ± 0,07	4,74 ± 0,45	1,46 ± 0,10

Valores representam a média ± e.p.m. (n= 9–10/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01). As massas relativas dos órgãos foram calculadas a partir da razão entre a massa do órgão (g) e a massa da fêmea prenhe no último dia de gestação (g) x 100.

Nas taxas reprodutivas houve aumento na implantação nos grupos EUG 1 (96,43%) e EUG 2 (100%) em comparação com o controle (90,91%). No entanto, as taxas de perda pré-implantação foram menores nos grupos EUG 1 (10%), EUG 2 (9,1%) e EUG 3 (10%) quando comparadas ao grupo controle (27,3%). Não houve perda pós-implantação nos grupos EUG 2 e EUG 3, enquanto que o grupo EUG 1 (5%) não diferiu significativamente do controle (16,7%). E os índices placentários foram reduzidos em todos os grupos tratados (11%) em relação aos seus respectivos controles (12%), como pode ser visualizada na tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros reprodutivos de ratas Wistar tratadas com eugenol do dia 6 a 15 da prenhez (período de organogênese).

Parâmetros reprodutivos	Controle	EUG 1 (37,5 mg/kg)	EUG 2 (187,5 mg/kg)	EUG 3 (375 mg/kg)
Ratas prenhes	9	10	9	9
Ganho de massa corporal durante organogênese (g)^a	24,46 ± 3,85	24,40 ± 3,76	24,24 ± 2,89	21,92 ± 2,72
Ganho de massa corporal durante prenhez (g)^a	31,15 ± 7,04	32,25 ± 7,76	31,82 ± 7,44	30,81 ± 7,31
Número de fetos vivos	75	96	90	85
Número de natimortos	0	0	0	0
Relação ninhada/progenitora^a	0,18 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,19 ± 0,01
Índice placentário (%)^b	12	11*	11*	11*
Razão sexual (M:F)^c	1:0,6	1:1,2	1:1,0	1:1,5
Massa absoluta das placentas (g)^a	4,93 ± 0,66	5,17 ± 0,35	5,05 ± 0,19	4,74 ± 0,45
Massa absoluta dos ovários (g)^a	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Número de sítios de implantação	94	108	92	91
Número de sítios de reabsorção	19	11	2	6
Número de corpos lúteos^a	11,78 ± 0,36	11,60 ± 0,52	11,33 ± 0,69	11,22 ± 0,57
Taxa de implantação (%)^b	90,91	96,43*	100****	90,91
Taxa de reabsorção (%)^b	16,67	0****	0****	0****
Taxa de perda pré-implantação (%)^b	27,27	10**	9,09****	10**
Taxa de perda pós-implantação (%)^b	16,67	5	0****	0****

Índices placentários (massa das placentas viáveis (g)/massa da ninhada (g) x 100), taxas de implantação (nº total de sítios de implantação/nº total de corpos lúteos x 100), taxas de reabsorção (nº total de sítios de reabsorção/nº total de sítios de implantação x 100), taxas de perda pré-implantação (nº de corpos lúteos – nº de sítios de implantações viáveis/ nº de corpos lúteos x 100), taxas de perda pós-implantação (nº de implantações – nº de fetos vivos/ nº de implantações x 100) e a razão sexual foi determinada pelo nº total de fetos machos/nº total de fetos fêmeas^c. Os valores estão expressos em média ± e.p.m. ou mediana. Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett^a, Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn^b, ou Teste do Qui-quadrado^c, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001).

5.2 Embriofetotoxicidade nos períodos de pré-implantação e organogênese

Na fase de pré-implantação não foram observadas alterações externas, nem houve diferenças significativas nas massas dos fetos, na razão sexual, nem na relação materno fetal. Porém, houve registro de um feto natimorto (1/77) nos grupos EUG 1 e EUG 2 e dois natimortos (2/78) no grupo EUG 3.

No período de organogênese não foram observadas diferenças significativas na massa dos fetos, na razão sexual, nem na relação materno fetal. E não foram observados natimortos em nenhum dos grupos tratado ou controle (Tabela 4). Além disso, o número de fetos vivos foi aparentemente mais elevado nos grupos tratados do que no controle.

5.3 Análise de alterações e/ou malformações internas durante organogênese

5.3.1 Análises visceral e esquelética

Durante as análises viscerais, foram observadas dilatação de artérias pulmonares em um (1/39) feto do grupo controle (2,6%) e em três (3/40) fetos do grupo EUG 3 (7,5%). Também houve dilatação da bexiga urinária em dois (2/39) fetos do controle (5,1%), três (3/51) fetos de EUG 1 (5,9%), um (1/46) feto em EUG 2 (4,35%) e um (1/40) feto em EUG 3 (5%), respectivamente. Ainda foram observadas ranhuras no palato em um (1/39) feto do controle (2,6%), seis (1/51) fetos de EUG 1 (9,8%), três (3/46) fetos de EUG 2 (4,35%) e dois (2/40) fetos de EUG 3 (5%). Contudo, essas alterações não foram estatisticamente significativas em comparação ao grupo controle e podem ser atribuídas ao acaso. Esses resultados indicam que a administração do eugenol não interfere de forma significativa no desenvolvimento visceral durante a organogênese.

Em relação às análises esqueléticas, os fetos foram analisados quanto ao número, morfologia e localização dos ossos. Foram observadas alterações estatisticamente significativas no desenvolvimento esquelético dos fetos quando comparados ao grupo controle e foram identificadas malformações como agenesia de falanges proximais das patas anteriores (C: 23,5%) no grupo EUG 1 (42,2%) e das patas posteriores (C: 29,4%) também em EUG 1 (57,8%). Redução do número

de vértebras cervicais (C: 2,9%) nos grupos EUG 1 (100%), EUG 2 (84,1%) e EUG 3 (100%), encurtamento de costelas (C: 0%) em EUG 2 (6,8%), ossificação incompleta do osso escamoso da cabeça (C: 0 %) no grupo EUG 1 (35,6%). Além disso, também foram significativas as malformações ósseas referentes à ossificação incompleta (C: 55,9%) e alteração morfológica do esterno (em forma de borboleta) (C: 2,9%) nos grupos EUG 2 (76,3%) e EUG 3 (29,6%), respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 – Relação das malformações esqueléticas dos fetos de fêmeas tratadas com eugenol durante período de organogênese (D₆ a D₁₅).

Malformações esqueléticas	Controle	EUG 1 (37,5 mg/kg)	EUG 2 (187,5 mg/kg)	EUG 3 (375 mg/kg)
Ossificação incompleta do escamoso	0/34 (0%)	16/45 (35,6%)**	10/44 (22,7%)	8/38 (21,0%)
Ossificação incompleta do esternébrio	19/34 (55,8%)	16/45 (35,6%)	25/44 (56,8%)	29/38 (76,3%)**
Ossificação incompleta do manúbrio (ponto)	1/34 (2,9%)	0/45 (0%)	0/44 (0%)	0/38 (0%)
Ausência de processo xifoide	0/34 (0%)	0/45 (0%)	0/44 (0%)	2/38 (5,3%)
Esterno em borboleta	1/34 (2,9%)	0/45 (0%)	4/44 (9,1%)	16/38 (29,6%)****
Agenesia de falanges proximais das patas anteriores	8/34 (23,5%)	19/45 (42,2%)*	10/44 (18,5%)	6/38 (15,8%)
Agenesia de falanges proximais das patas posteriores	10/34 (29,4%)	26/45 (57,8%)	17/44 (38,6%)	18/38 (47,3%)
Agenesia do último centro esternal	0/34 (0%)	1/45 (2,2%)	0/44 (0%)	0/38 (0%)
Costelas encurtadas	0/34 (0%)	0/45 (0%)	3/44 (6,8%)*	0/38 (0%)
Ausência de vértebras cervicais	1/34 (2,9%)	45/45 (100%)****	37/44 (84,1%)	38/38 (100%)****

Os dados de malformações esqueléticas fetais foram tabelados de acordo com os grupos controle (água + tween 80 à 2%) e os grupos do eugenol (EUG 1, EUG 2, EUG 3) e organizados a partir da relação entre número de fetos afetados/nº total de fetos analisados e valores entre parênteses representam o percentual de malformações esqueléticas observadas. Estatisticamente diferente do grupo controle (Teste do Qui-quadrado, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001).

6 DISCUSSÃO

O eugenol é um monoterpreno da classe dos fenilpropanoides, que pode ser obtido do óleo essencial de várias espécies vegetais, incluindo insumos alimentares como noz-moscada (TALEUZZAMAN; JAHANGIR; GILANI, 2017), cravo da índia (SANTIN et al., 2011) e canela (MONTEIRO et al., 2017), além de ser amplamente utilizado em formulações farmacêuticas presentes no cotidiano das gestantes.

O estudo da administração desse monoterpreno por via oral sobre a gestação de ratas Wistar apresentou redução significativa no consumo de ração durante a fase de pré-implantação (Figura 7), nos órgãos maternos indicou a presença de nódulos enrijecidos nos rins, adrenais, pâncreas e nos pulmões associados com edema (Quadro 1).

Outros estudos já indicaram que o eugenol apresenta toxicidade materna durante a pré-implantação. Em camundongos fêmeas, o eugenol foi incluído na dieta desde o período de acasalamento até o 4º dia da pré-implantação, resultando na redução de núcleos celulares, relacionados com dificuldade de implantação do blastocisto no útero e aumento da incidência de morte embrionária (DOMARACKÝ et al., 2007). Do mesmo modo, o estudo *in vitro* com células tronco embrionárias considerou que o eugenol em pequenas concentrações (ID_{50} : $5,43 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$) é capaz de inibir a proliferação dessas células e pode ser tóxico para os embriões (LIU et al., 2017).

A presença de edema pulmonar observada após tratamento de fêmeas prenhes com o eugenol durante a pré-implantação é outro indício de toxicidade do eugenol e já foi relatada após a administração dessa substância em ratos (SOBER, H.; HOLLANDER; SOBER, E., 1950), hamsters (LAVOIE et al., 1986), coelhos (MCDONALD; HEFFNER, 1991) e sapos (GOULET; VACHON; HÉLIE, 2011). McDonald; Heffner (1991) avaliaram o efeito da administração por via endovenosa do eugenol (0,1 mM) em pulmões de coelhos e relacionaram a presença de edema pulmonar com a formação de um intermediário metabólico tóxico do eugenol.

Além disso, as massas das placentas, ovários e pâncreas (Tabela 1) apresentaram redução estatisticamente significativa após administração do eugenol, via oral, durante pré-implantação. E promoveu redução na taxa de implantação e aumento nas taxas de reabsorção e de perdas pré e pós-implantação (Tabela 2).

De modo semelhante, o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), que possui o monoterpeneo 1,8 cineol como constituinte majoritário, administrado nas doses de 242, 484 e 968 mg/kg, via oral, durante a pré-implantação (5° ao 7° dia de prenhez), de ratas Wistar promoveu redução de 56,1; 70,73; 65,3% no consumo de ração na dose de 968 mg/kg nos dias 6, 7 e 8 respectivamente em relação ao grupo controle, enquanto que as doses de 484 e 968 mg/kg reduziram a massa dos ovários em 14,29% quando comparadas aos seus respectivos controles. No entanto, não houve diferenças significativas no número de sítios de implantação ou nas taxas de perda pré e pós-implantação (GUERRA et al., 2009).

Caldas et al. (2016) estudaram o efeito do 1,8 cineol nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg sobre os parâmetros reprodutivos de ratas prenhes durante a organogênese e observaram que essa substância isolada promovia redução no ganho de massa materno na dose de 1000 mg/kg durante pré-implantação e nas três doses administradas durante período de organogênese. Além disso, foi observado presença de natimortos em fêmeas tratadas com 1000 mg/kg do 1,8 cineol durante a pré-implantação e a dose de 250 mg/kg promoveu redução no número de corpos luteos durante a organogênese, sugerindo possível toxicidade materna e fetal.

Em relação ao eugenol, até o presente não tinham sido encontrados dados na literatura sobre a influência desse monoterpeneo na fase de organogênese em ratas Wistar. Os resultados obtidos da administração do eugenol durante esta fase gestacional mostraram redução no consumo de ração (Figura 10) e da massa do pâncreas (Tabela 3), bem como aumento da incidência de nódulos enrijecidos em alguns órgãos maternos (Quadro 2).

Sabe-se que a análise de sinais clínicos de toxicidade, redução do ganho de massa corporal, variação na massa dos órgãos e alteração no consumo de água e ração são parâmetros úteis na avaliação da homeostase materna, de modo que alterações nesses parâmetros podem significar toxicidade materna (OECD, 2015).

Dessa forma, a redução da ingesta de alimentos e a presença de nódulos enrijecidos nos órgãos maternos nas fases de pré-implantação e organogênese sugerem que essa substância pode ocasionar toxicidade materna durante período gestacional de ratas Wistar.

Espécies reativas de oxigênio, íons metálicos e enzimas do complexo citocromo P450 podem promover alterações estruturais nos fenilpropanoides e

originar radicais fenoxil que se associam a proteínas e são capazes de originar metabólitos tóxicos pertencentes à classe das quinonas (KORKINA et al., 2011).

Segundo Thompson; Constantin-Teodosiu; Moldéus (1991) a metabolização do eugenol ocorre no fígado por meio do citocromo P450 e origina um intermediário metabólico reativo denominado quinona metide. Nesse sentido, apesar do eugenol possuir atividades antioxidante e anti-inflamatória, a partir do sequestro de radicais livres (GÜLÇİN, 2011) ou da inibição da expressão de COX-2 (KIM et al., 2003), em baixas concentrações (5–10 µM) esse óleo essencial pode atuar como pró-oxidante mediante interação enzimática, reações envolvendo oxigênio e na presença de luz (ATSUMI; FUJISAWA; TONOSAKI, 2005).

A exposição diária ao eugenol (1400 a 4000 mg/kg) por via oral durante 34 dias promoveu lesões hepáticas e aumento das adrenais em ratos (HAGAN et al., 1965). Goulet; Vachon; Hélie (2011) também observaram lesões dose-dependente nos rins, fígado e pulmões de sapos africanos (*Xenopus laevis*) imersos em solução aquosa de eugenol (375 µL/L) por até 72h.

O modelo de toxicidade reprodutiva empregado para realização deste trabalho consiste da administração prolongada do eugenol durante a gestação de ratas Wistar, em que as fêmeas prenhes recebem a administração por via oral desse monoterpeno durante seis dias no período de pré-implantação e 10 dias na organogênese. Os resultados obtidos indicaram presença de nódulos enrijecidos nos órgãos maternos, com efeito acentuado durante organogênese.

No trabalho de Goulet; Vachon; Hélie (2011) sapos africanos foram expostos ao eugenol por 24 ou 72h e com o aumento do tempo de exposição os danos renais e hepáticos foram mais acentuados. No entanto, quando a exposição foi interrompida e os animais passaram duas semanas se recuperando do tratamento os danos observados foram reversíveis.

Isso nos leva a acreditar que o eugenol pode atuar de maneira semelhante no organismo das ratas prenhes, pois durante a pré-implantação os animais tiveram tempo de 15 dias para se recuperar do tratamento que durou apenas 6 dias, o que explicaria a presença pouco expressiva de nódulos nos órgãos maternos quando comparados com os nódulos presentes nos órgãos maternos durante organogênese, cujo tratamento teve duração de 10 dias e tempo de recuperação de apenas 6 dias.

A partir do exposto, podemos sugerir que a administração prolongada do eugenol durante as fases de pré-implantação e organogênese em ratas Wistar

produziu toxicidade materna. Existe a hipótese que deve ser testada, que o efeito seja devido à formação do intermediário metabólico e da capacidade pró-oxidante deste óleo na presença de enzimas hepáticas.

Nosso trabalho avaliou apenas aspectos morfológicos externos das fêmeas tratadas com eugenol nas fases gestacionais de pré-implantação e organogênese, dando subsídios para futuros estudos toxicocinéticos, com dosagens bioquímicas, hematológicas e análises histopatológicas, a fim de elucidar o comportamento fisiológico do eugenol ao longo da gestação de ratas Wistar.

No momento em que o blastocisto se adere à parede uterina tem-se início uma série de reações para permitir a invasão e aderência de uma das camadas da interface do blastocisto, denominada de trofoblasto, no útero. Após adesão do trofoblasto, essa camada sofre diferenciação celular para dar origem à interface fetal da placenta. E todo esse processo de migração até a implantação do blastocisto ao útero é denominado de pré-implantação.

Durante o período de implantação o organismo materno aumenta a taxa de oxigenação placentária, que leva a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) (JAUNIAUX et al., 2000) envolvidas nos processos fisiológicos de proliferação e sinalização celular.

Além disso, o útero passa por uma série de modificações metabólicas e interações imunológicas, incluindo aumento da demanda de glicose e da taxa de oxigenação uterina, além do recrutamento de elementos pró e anti-inflamatórios como prostaglandinas, citocinas, moléculas de adesão celular, entre outros, que preparam o útero para receber o conceito e auxiliam no processo de proliferação e diferenciação celular necessárias para formação da placenta após estabelecimento do embrião no útero (MOURIK; MACKLON; HEIJNEN, 2009).

As prostaglandinas estão envolvidas no processo de ovulação, decidualização uterina, pré-implantação e outros processos vitais durante desenvolvimento embrionário e são sintetizadas a partir da conversão do ácido araquidônico pela via das ciclooxygenases (MATSUMOTO et al., 2001).

Durante a gestação a enzima ciclooxygenase 2 (COX-2) pode ser modulada pelos hormônios estrogênio e progesterona. No modelo de cultura de células endometriais primárias *in vitro* as células cultivadas foram pré-tratadas com anti-progestina (RU-486) ou anti-estrogênio (ICI-182, 780) na concentração de 1 μ M por 1 h, seguida do tratamento com progesterona (100 nM) ou estradiol (100 nM) por 48

h, respectivamente, ou de células tratadas apenas com progesterona ou estradiol nas mesmas concentrações por 48 h. As células tratadas tiveram a expressão de COX-2 avaliada por análises de Western Blot, revelando que na presença de estradiol a expressão dessa enzima foi aumentada e células pré-tratadas com o anti-estrogênio por 1 h tiveram a expressão da COX-2 reduzida, enquanto que na presença de progesterona ou da anti-progestina a expressão dessa enzima não foi alterada, sugerindo que nessas condições a COX-2 é regulada pela presença de estrogênio (ST-LOUIS et al., 2010).

Além disso, um estudo foi realizado com camundongos fêmeas com deleção do gene para receptores de estrógeno α (ERKO α), estas foram ovariectomizadas e submetidas a um tratamento hormonal com injeções subcutâneas da associação de estrogênio e progesterona ou apenas de progesterona por três dias. Os animais receberam estradiol (100 ng/100 μ L de óleo de gergelim) do 1° ao 3° dia de tratamento e no 6° dia receberam uma injeção por via subcutânea de progesterona (1 mg) juntamente com estradiol (6,7 ng) em 100 μ L de óleo de gergelim até o 8° dia de tratamento, quando fêmeas receberam de 12 a 20 embriões doados em cada corno uterino. Após inserção dos embriões no útero os animais continuaram recebendo injeções subcutâneas contendo progesterona e estradiol diariamente, no 15° dia tiveram os cornos uterinos coletados para contagem dos sítios de implantação. Nesse modelo experimental foi observado que animais ERKO α ($0,78 \pm 0,3$) tiveram menos sítios de implantação quando comparado com animais normais ($2,89 \pm 0,5$), sugerindo que os receptores de estrogênio (ER α) funcionais são importantes para o processo de implantação embrionária (HEWITT et al., 2002).

A inibição da secreção de estrogênio durante a fase de pré-implantação, interfere no processo de proliferação epitelial uterina e dificulta a implantação do blastocisto ao útero (SINGH et al., 1996). Dessa forma, o aumento de perdas pós-implantação estão relacionadas com falhas e inviabilização da implantação do blastocisto e a ocorrência de reabsorções indica interrupção no desenvolvimento embriofetal provocada por inadequado revestimento uterino para recepção do embrião ou por toxicidade materna (YAKUBU; BUKOYE, 2009). Além disso, a inibição seletiva de COX-2 durante a gestação tem sido relacionada com toxicidade reprodutiva e afeta o processo de decidualização do endométrio, resultando em redução da fertilidade e falha no processo de implantação (LIM et al., 1997).

Em vista disso, o eugenol apresenta atividade antiestrogênica e é capaz de competir com o 17- β -estradiol por receptores hormonais do tipo ER α e ER β (HOWES et al., 2002) o que pode contribuir para o desbalanço hormonal entre progesterona e estrogênio durante o início da gestação, acarretando em irregularidades durante migração do blastocisto ao útero na fase de pré-implantação de ratas Wistar.

Por outro lado, os fenilpropanoides podem desempenhar suas atividades anti-inflamatórias inibindo enzimas pró-inflamatórias como óxido nítrico sintase (iNOs), NADPH, ciclooxigenases, entre outras (KORKINA et al., 2011). E as atividades anti-inflamatórias (YOGALAKSHMI; VISWANATHAN; ANURADHA, 2010) e antiproliferativa do eugenol parecem estar relacionadas com a inibição seletiva de COX-2, com consequente redução de prostaglandinas (KIM et al., 2003). Mas na presença de enzimas do complexo P450, íons metálicos e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KORKINA et al., 2011) o eugenol passa a desempenhar atividade pró-oxidante (THOMPSON; CONSTANTIN-TEODOSIU; MOLDÉUS, 1991).

Liu et al. (2017) observaram a capacidade embriotóxica do eugenol (ID₅₀: 5,43 $\pm$ 0,72 μ g/mL) *in vitro* após 2h de incubação por meio do teste do MTT sobre cultura de células-tronco embrionárias, que inibiu a proliferação celular das células-tronco. Além disso, Domaracký et al. (2007) relacionaram a inclusão do eugenol (375 mg/kg) na dieta de camundongos desde período de acasalamento até o dia 4 de prenhez com dificuldade de implantação do blastocisto no útero, relatando redução do número de núcleos celulares e aumento da incidência de morte celular no período de pré-implantação.

Os resultados obtidos mostram que na fase de pré-implantação houve presença de natimortos, aumento de taxas de reabsorção e de perda pré e pós-implantação, com redução dos índices placentários. Entretanto, na organogênese foi observado aumento das taxas de implantação e redução das taxas de perda pré e pós-implantação e de reabsorção nos grupos EUG 1, EUG 2 e EUG 3. Apesar disso, houve redução dos índices placentários em todos os grupos tratados com eugenol durante a fase de organogênese, o que sugere que o eugenol apresenta maiores riscos de causar toxicidade embrionária durante o período de pré-implantação, enquanto que a toxicidade fetal pode estar relacionada com a administração desse óleo essencial durante o período de pré-implantação e organogênese.

O índice placentário é utilizado como padrão para avaliar a função placentária e serve para indicar a relação de troca de nutrientes entre mãe e feto, mediadas pela placenta (KINGDOM; KAUFMANN, 1999). Dessa forma, alterações na relação entre placenta, mãe e feto podem reduzir o fluxo sanguíneo útero-placentário, levando a redução da oxigenação e nutrição fetal e aumenta as chances de retardo de desenvolvimento embriofetal e incidências de malformações congênitas (DÍAZ; POWELL; JANSSON, 2014).

Nesse aspecto, Zhang; Kulkarni; Kulkarni (2000) estudaram a oxidação do eugenol (4 mM) em presença de peroxidase placentária humana durante 2 minutos e concluíram que essa reação em pH 8,0 gera pico máximo de quinona metide como intermediário metabólico, mas que essa reação pode ser reversível a partir da adição de glutathione reduzida. No entanto, apesar de terem realizado o estudo *in vitro*, sugeriram que a condução do experimento *in vivo* poderia levar a uma disfunção placentária, com efeitos tóxicos para o feto. Essas observações, juntamente com a redução dos índices placentários dão suporte a nossa hipótese de que o eugenol é tóxico para os fetos quando as progenitoras são expostas a essa substância durante período de organogênese.

O período gestacional envolve uma série de mudanças fisiológicas para manter e nutrir o feto, no entanto fatores genéticos (alterações cromossômicas), ambientais (incidência de raios U.V., vírus, substâncias químicas) e multifatoriais (combinação de fatores genéticos e ambientais) podem interferir com o organismo materno e/ou fetal, provocando variações ou malformações congênitas (WHO, 2003).

No que se refere ao processo de formação óssea, sabemos que pode ocorrer por meio de duas formas distintas denominadas de endocondral ou intramembranosa. O processo endocondral ocorre quando a cartilagem é precursora do tecido ósseo, enquanto que o intramembranoso não necessita de cartilagem para formar o osso.

O processo de formação óssea intramembranosa envolve um centro de ossificação que será circundado por osteoblastos para deposição do tecido ósseo do centro para as bordas, este processo permite o aumento da circunferência e faz o osso crescer até alcançar seu tamanho definitivo (ZHANG et al., 2018).

Apesar disso, durante o desenvolvimento fetal há predominância do processo endocondral, ou seja, o feto forma uma espécie de molde cartilaginoso que será substituído pela matriz óssea ao longo do desenvolvimento. Esse processo envolve proliferação de condrócitos, calcificação da matriz, vascularização do tecido em formação e posterior degradação da matriz cartilaginosa para o início da calcificação dando lugar ao novo tecido ósseo (MACKIE et al., 2008).

Uma forma de identificar a ocorrência de malformações fetais em ratos é a utilização da técnica de diafanização e coloração com alizarina para avaliar a estrutura óssea fetal. Esse processo permite que a associação dos reagentes com a alizarina core regiões ricas em deposição de cálcio, fazendo com que os tecidos sejam clareados e a estrutura óssea fique em evidência numa coloração vermelho-arroxeadada. Assim, ossos fracamente corados ou com ausência de coloração podem indicar retardo no desenvolvimento ósseo de fetos (ALIVERTI, 1979).

Em seu trabalho, Burdan et al. (2008) observaram que a administração por via oral dos inibidores não seletivos de ciclooxigenase: tolmetina (850 mg/kg) e ibuprofeno (200 mg/kg) três vezes ao dia, piroxicam (30 mg/kg) uma vez ao dia do 8º ao 21º dia de gestação em ratas promoveram retardo no crescimento intrauterino e deficiência de mineralização nos ossos frontal, parietal, interparietal, supraoccipital e esterno dos fetos.

Por sua vez, o eugenol foi relacionado com a inibição da expressão de COX-2 no mecanismo de prevenção hepática (YOGALAKSHMI; VISWANATHAN; ANURADHA, 2010) e no modelo de indução de COX-2 por lipopolissacarídeos em macrófagos de camundongos (KIM et al., 2003).

Além disso, a implementação de borneol e mentol na dieta de ratos marcados com tetraciclina (H^3) indicou que o consumo de 23 g de ração contendo 100 mg/dia desses monoterpenos durante 10 dias inibiram a reabsorção óssea de maneira reversível após 52h de interrupção do consumo de ração suplementada (MÜHLBAUER et al., 2003).

Mediante o exposto, nesse trabalho foram identificadas algumas alterações significativas no número e/ou forma dos ossos da cabeça, esternóbrio, ausência de falanges proximais das patas anteriores, encurtamento de costelas e ausência de costelas cervicais nos fetos.

Considerando que alguns monoterpenos desempenham atividade de inibição de remodelação óssea por mecanismos ainda desconhecidos e que inibidores de

COX-2 reduzem a mineralização óssea, podemos sugerir que o eugenol pode interferir no metabolismo ósseo, resultando em malformações esqueléticas e consequente retardo do desenvolvimento ósseo dos fetos.

Dessa forma, levantamos a hipótese de que o eugenol pode atuar na remodelação óssea por meio da inibição da enzima ciclooxigenase 2 durante o período de organogênese, contudo esta é uma hipótese que precisa ser melhor investigada para ser confirmada.

7 CONCLUSÃO

O estudo toxicológico reprodutivo do eugenol foi realizado sobre as fases de pré-implantação e organogênese de ratas Wistar e revelou sinais de toxicidade materna com redução do consumo de ração e aumento da incidência de nódulos nos órgãos das progenitoras.

A administração por via oral do eugenol causou redução na taxa de implantação dos blastocistos com aumento da taxa de reabsorção e redução dos índices placentários durante a fase de pré-implantação, sugerindo efeito embriotóxico. Enquanto que na fase de organogênese causou redução nos índices placentários e malformações esqueléticas nos fetos, indicando que esse óleo essencial atravessa a barreira placentária e influencia no balanço de troca de nutrientes, gases e excretas entre mãe e feto, repercutindo em toxicidade fetal.

Em conclusão, a administração do eugenol nas doses analisadas durante as fases de pré-implantação e organogênese causou sinais de toxicidade materna e fetal. No entanto, vale salientar que os aspectos analisados neste trabalho representam dados obtidos de observações macroscópicas tanto das fêmeas quanto dos fetos analisados e sugerem a realização de outras análises toxicocinéticas, dosagens bioquímicas, hematológicas e análises histopatológicas para elucidar as alterações farmacológicas do eugenol durante a gestação de ratas Wistar.

REFERÊNCIAS

- ALIVERTI, V. et al. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. **Teratology**, v. 20, n. 2, p. 237-242, 1979.
- ASHA, M. K. et al. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 669-670, 2001.
- ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. **Toxicology in vitro**, v. 19, n. 8, p. 1025-1033, 2005.
- AYACH, W. et al. Associação glicemia de jejum e fatores de risco como teste para rastreamento do diabetes gestacional. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, p. 329-335, 2005.
- AYDOĞMUŞ, Z. et al. Determination of eugenol in plants and pharmaceutical form by HPLC with amperometric detection at graphene-modified carbon paste electrode. **Graphene Technology**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2018.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BASAR, S.; KOCH, A.; KÖNIG, W. A. A verticillane-type diterpene from *Boswellia carterii* essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 5, p. 315-318, 2001.
- BÓ, W. D. et al. Eugenol reduces acute pain in mice by modulating the glutamatergic and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) pathways. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 5, p. 517-525, 2013.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**. Brasília, DF, 2015.
- BRASÍLIA. Conselho Federal de Medicina Veterinária do Brasil. Comissão de Ética Bioética e Bem-Estar Animal (CEBEA). **Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia de animais**. Brasília, DF, 2013.
- BRENT, R. L. et al. Reproductive and teratology effects of electromagnetic fields. **Reproductive teratology**, v. 7, p. 535-580, 1993.
- BURDAN, F. et al. Cyclooxygenase inhibitors affect bone mineralization in rat fetuses. **Cells Tissues Organs**, v. 187, n. 3, p. 221-232, 2008.
- CALDAS, G. F. R. et al. Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpene 1, 8-cineole (eucalyptol) in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 297-306, 2016.

CÂMARA, A. C. L. et al. Embryotoxic effects of Poincianella (Caesalpinia) pyramidalis leaves on pregnant rats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 2, p. 137-142, 2017.

CARDIA, G. F. E. et al. Effect of Lavender (Lavandula angustifolia) Essential Oil on Acute Inflammatory Response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

CHAN, V. S. W. A. Mechanistic perspective on the specificity and extent of COX-2 inhibition in pregnancy. **Drug safety**, v. 27, n. 7, p. 421-426, 2004.

CHATTERJEE; BHATTACHARJEE. Use of eugenol-lean clove extract as a flavoring agent and natural antioxidant in mayonnaise: product characterization and storage study. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 8, p. 4945-4954, 2015.

COOPER, R. L.; GOLDMAN, J. M.; VANDENBERGH, J. G. Monitoring of estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. In Methods in Toxicology. **Female reproductive toxicology**, p. 45-56, 1993.

COSTA-SILVA, J. H. et al. A toxicological evaluation of the effect of Carapa guianensis Aublet on pregnancy in Wistar rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 122-126, 2007.

DAMIANI, C. E. N.; ROSSONI, L. V.; VASSALLO, D. V. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. **Vascular pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 59-66, 2003.

DÍAZ, P.; POWELL, T. L.; JANSSON, T. The role of placental nutrient sensing in maternal-fetal resource allocation. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 4, p. 1-10, 2014.

DOMARACKÝ, M. et al. Effects of selected plant essential oils on the growth and development of mouse preimplantation embryos in vivo. **Physiological research**, v. 56, n. 1, p. 97-104, 2007.

EKAMBARAM, G.; KUMAR, S. K. S.; JOSEPH, L. D. Comparative Study on the Estimation of Estrous Cycle in Mice by Visual and Vaginal Lavage Method. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 11, n. 1, p. AC05, 2017.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 130, n. 3, p. 325-337, 2001.

FARAG, M. A. et al. Anti-acetylcholinesterase activity of essential oils and their major constituents from four Ocimum species. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 71, n. 11-12, p. 393-402, 2016.

FEITOSA, A. C. R. et al. Impacto do Uso de Diferentes Critérios Diagnósticos na Prevalência de Dislipidemia em Gestantes. **Arq Bras Cardiol**, v. 109, n. 1, p. 30-38, 2017.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GOULET, F.; VACHON, P.; HELIE, P. Evaluation of the toxicity of eugenol at anesthetic doses in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Toxicologic pathology**, v. 39, n. 3, p. 471-477, 2011.

GUERRA, M. O. et al. Intra uterine growth retardation in rats treated with essential oil of *rosmarinus officinalis* linn. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 1, p. 8-13, 2009.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of eugenol: A structure–activity relationship study. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 9, p. 975-985, 2011.

HAGAN, E. C. et al. Toxic properties of compounds related to safrole. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 18-24, 1965.

HAMDAMIAN, S. et al. Effects of aromatherapy with *Rosa damascena* on nulliparous women's pain and anxiety of labor during first stage of labor. **Journal of integrative medicine**, v. 16, n. 2, p. 120-125, 2017.

HEWITT, S. C. et al. Studies using the estrogen receptor α knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. **Biology of reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1268-1277, 2002.

HOLLENBACH, C. B. Estudo da toxicidade reprodutiva de duas formulações fitoterápicas comerciais contendo soja (*Glycine max* (L.) Merr) em ratos wistar. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 845-852, 2008.

HOWES, M. J. R. et al. Assessment of estrogenic activity in some common essential oil constituents. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 54, n. 11, p. 1521-1528, 2002.

HUBSCHER, C. H.; BROOKS, D. L.; JOHNSON, J. R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 80, n. 2, p. 79-87, 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans**. World Health Organization, v. 36, França, 1985.

JADARAMKUNTI, U. C.; KALIWAL, B. B. Possible mechanisms for the anti-implantation action of dicofol in albino rats. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 217-226, 2001.

JAUNIAUX, E. et al. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. **The American journal of pathology**, v. 162, n. 1, p. 115-125, 2003.

JUNG, J. et al. Anti-gastric actions of eugenol and cinnamic acid isolated from Cinnamomi Ramulus. **Yakugaku Zasshi**, v. 131, n. 7, p. 1103-1110, 2011.

KASUGAI, S.; HASEGAWA, N.; OGURA, H. A Simple In Vito Cytotoxicity Test Using the MTT (3-(4, 5) Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyl Tetrazolium Bromide) Colorimetric Assay: Analysis of Eugenol Toxicity on Dental Pulp Cells (RPC-C2A). **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 52, n. 1, p. 95-100, 1990.

KAUR, G.; ATHAR, M.; ALAM, M. S. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. **Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center**, v. 49, n. 3, p. 290-301, 2010.

KIANPOUR, M. et al. Effect of lavender scent inhalation on prevention of stress, anxiety and depression in the postpartum period. **Iranian journal of nursing and midwifery research**, v. 21, n. 2, p. 197, 2016.

KIM, S. S. et al. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264. 7 cells. **Life sciences**, v. 73, n. 3, p. 337-348, 2003.

KINGDOM, J. C. P; KAUFMANN, P. Oxygen and Placental Vascular Development. In: Roach R.C., Wagner P.D., Hackett P.H. **Hypoxia. Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol 474, p. 259-275, 1999.

KORKINA, L. et al. Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 10, p. 823-835, 2011.

KWON, H. et al. Cinnamon and its components suppress vascular smooth muscle cell proliferation by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitors. **The American journal of Chinese medicine**, v. 43, n. 4, p. 621-636, 2015.

LAVOIE, E. J. et al. Toxicity studies on clove cigarette smoke and constituents of clove: determination of the LD 50 of eugenol by intratracheal instillation in rats and hamsters. **Archives of toxicology**, v. 59, n. 2, p. 78-81, 1986.

LIM, H. et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 197-208, 1997.

LIMA, C. S. **Estudo da toxicidade não clínico em ratos submetidos ao tratamento com óleos resina de Copaifera duckei Dwyer (subcrônico e reprodutivo)**. 2014. 265f. Tese (Doutorado em biodiversidade tropical) – Universidade Federal do Amapá, Amapá, 2014.

LIS, A. et al. Chemical Composition of the Essential Oils from Different Morphological Parts of *Pinus cembra* L. **Chem Biodivers**, v. 14, n. 4, 2017.

LIU, H. et al. Embryotoxicity estimation of commonly used compounds with embryonic stem cell test. **Molecular medicine reports**, v. 16, n. 1, p. 263-271, 2017.

LOURENÇO, A. C. S. et al. Copaiba oil (*Copaifera langsdorfii* Desf.) on mouse reproductive patterns and embryonic or fetal development. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 11, n. 4, p. 407-413, 2009.

MAGALHÃES, C. B. et al. In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 4, p. 845-851, 2010.

MACKIE, E.J. et al. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 1, p. 46-62, 2008.

MANKUTA, D. et al. Lipid profile in consecutive pregnancies. **Lipids in health and disease**, v. 9, n. 1, p. 58, 2010.

MATSUMOTO, H. et al. Diversification of cyclooxygenase-2-derived prostaglandins in ovulation and implantation. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1557-1565, 2001.

MCDONALD, J. W.; HEFFNER, J. E. Eugenol Causes Oxidant-mediated Edema in Isolated Perfused Rabbit Lungs 1–4. **Am. Rev. Respir. Dis**, v. 143, p. 806-809, 1991.

MEDEIROS, R. S. et al. New information for managing *Copaifera multijuga* Hayne for oleoresin yield. **Forest Ecology and Management**, v. 414, p. 85-98, 2018.

MELCHIORRE, K. et al. Maternal cardiovascular function in normal pregnancy: evidence of maladaptation to chronic volume overload. **Hypertension**, apr., 2016.

MEYER, G. T.; BRUCE, N. W. The cellular pattern of corpus luteal growth during pregnancy in the rat. **The Anatomical Record**, v. 193, n. 4, p. 823-830, 1979.

MNAFGUI, K. et al. Anti-inflammatory, antithrombotic and cardiac remodeling preventive effects of Eugenol in Isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rat. **Cardiovascular toxicology**, v. 16, n. 4, p. 336-344, 2015.

MONTEIRO, I. N. et al. Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* Presl on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 238, p. 54-57, 2017.

MOURIK, M. S. M.; MACKLON, N. S.; HEIJNEN, C. J. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. **Journal of leukocyte biology**, v. 85, n. 1, p. 4-19, 2009.

MURÁRIKOVÁ, A. et al. Characterization of Essential Oil Composition in Different Basil Species and Pot Cultures by a GC-MS Method. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1221, 2017.

NANTIA, E. A. et al. Parastar insecticide induced changes in reproductive parameters and testicular oxidative stress biomarkers in Wistar male rats. **Toxicology and industrial health**, v. 34, n. 7, p. 499-506, 2018.

NIU, Xiao-xue et al. Changes of secondary metabolites and trace elements in *Gentiana macrophylla* flowers: a potential medicinal plant part. **Chinese herbal medicines**, v. 6, n. 2, p. 145-151, 2014.

NORDENG, H.; HAVNEN, G. C. Impact of socio-demographic factors, knowledge and attitude on the use of herbal drugs in pregnancy. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 84, n. 1, p. 26-33, 2005.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for testing of chemicals, OECD 421. **Reproduction/developmental toxicity screening test**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2015.

OKADA, N. et al. Induction of cytotoxicity and apoptosis and inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by eugenol-related compounds. **Anticancer research**, v. 25, n. 5, p. 3263-3269, 2005.

PANDEY, M. et al. Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential source of therapeutics. **Journal of Pharmacognosy and phytotherapy**, v. 3, n. 1, p. 113-117, 2011.

POMA, P. et al. Chemical composition, in vitro antitumor and pro-oxidant activities of *Glandora rosmarinifolia* (Boraginaceae) essential oil. **PloS one**, v. 13, n. 5, 2018.

PRASAD, S. N.; MURALIDHARA. Neuroprotective efficacy of eugenol and isoeugenol in acrylamide-induced neuropathy in rats: behavioral and biochemical evidence. **Neurochemical research**, v. 38, n. 2, p. 330-345, 2013.

ROCHA, C. F. et al. Action of the hydroethanolic extract of the flowers of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen on the reproductive performance of Wistar females rats: A popular female aphrodisiac from the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 214, p. 301-308, 2018.

SAID, M. M.; RABO, M. M. Neuroprotective effects of eugenol against aluminium-induced toxicity in the rat brain. **Archives of industrial hygiene and toxicology**, v. 68, n. 1, p. 27-36, 2017.

SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, R. A.; COSTA, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific reports**, v. 6, p. 29265, 2016.

SANTIN, J. R. et al. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 383, n. 2, p. 149-158, 2011.

SANTOS, F. M. et al. Metabolic investigation in patients with nephrolithiasis. **Einstein (São Paulo)**, v. 15, n. 4, p. 452-456, 2017.

SCHOLTEN, R. R. et al. Low plasma volume in normotensive formerly preeclamptic women predisposes to hypertension. **Hypertension**, nov. 2015.

SHARMA, U. K.; SHARMA, A. K.; PANDEY, A. K. Medicinal attributes of major phenylpropanoids present in cinnamon. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 156, 2016.

SIBBRITT, D. W. et al. The self-prescribed use of aromatherapy oils by pregnant women. **Women and birth**, v. 27, n. 1, p. 41-45, 2014.

SIDDIQUI, A. H. et al. Pulmonary function in advanced uncomplicated singleton and twin pregnancy. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 40, n. 3, p. 244-249, 2014.

SILVA, F. F. M. et al. Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 34, 2018.

SINGH, M. M. et al. Uterine estradiol and progesterone receptor concentration, activities of certain antioxidant enzymes and dehydrogenases and histoarchitecture in relation to time of secretion of nidatory estrogen and high endometrial sensitivity in rat. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 59, n. 2, p. 215-224, 1996.

SOBER, H. A.; HOLLANDER, F.; SOBER, E. K. Toxicity of Eugenol: Determination of LD50 on Rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 73, n. 1, p. 148-151, 1950.

SOLECKI, R. et al. Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. Report of the third workshop on the terminology in developmental toxicology: berlin, 2000. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 6, p. 713-721, 2001.

SOMA-PILLAY, P. et al. Physiological changes in pregnancy. **Cardiovascular journal of Africa**, v. 27, n. 2, p. 89, 2016.

SORDELLI, M. S. et al. Cyclooxygenase-2 prostaglandins mediate anandamide-inhibitory action on nitric oxide synthase activity in the receptive rat uterus. **European journal of pharmacology**, v. 685, n. 1-3, p. 174-179, 2012.

SOUNDRAN, V. et al. Hepatotoxicity of eugenol. **Ancient science of life**, v. 13, n. 3-4, p. 213, 1994.

STAPLES, R. E.; SCHNELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in the kohalizerin red S method for fetal bone. **Stain Technology**, v. 39, p. 61-63, 1964.

ST-LOUIS, I. et al. Expression of COX-1 and COX-2 in the endometrium of cyclic, pregnant and in a model of pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 103, 2010.

STREVEENS, H. et al. Serum cystatin C for assessment of glomerular filtration rate in pregnant and non-pregnant women. Indications of altered filtration process in pregnancy. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 62, n. 2, p. 141-147, 2002.

TAIRA, J. et al. Essential oil phenyl propanoids. Useful as OH scavengers?. **Free radical research communications**, v. 16, n. 3, p. 197-204, 1992.

TALEUZZAMAN, M.; JAHANGIR, A.; GILANI, S. J. Quantification and Identification of Bioactive Eugenol in Myristica fragrans Seed Using Validated High Performance Thin Layer Chromatography Technique. **Pharm Anal Acta**, v. 8, n. 563, p. 2, 2017.

THOMPSON, D. C.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; MOLDÉUS, P. Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes. **Chemico-biological interactions**, v. 77, n. 2, p. 137-147, 1991.

VIEIRA, R. F. et al. Genetic diversity of Ocimum gratissimum L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 3, p. 287-304, 2001.

WANG, X. et al. Support for Natural Small-Molecule Phenols as Anxiolytics. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2138, 2017.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World atlas of birth defects. **Geneva, Switzerland**, 2003.

YAKUBU, M. T.; BUKOYE, B. B. Abortifacient potentials of the aqueous extract of Bambusa vulgaris leaves in pregnant Dutch rabbits. **Contraception**, v. 80, n. 3, p. 308-313, 2009.

YOGALAKSHMI, B.; VISWANATHAN, P.; ANURADHA, C. V. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicology**, v. 268, n. 3, p. 204-212, 2010.

ZHANG, H. et al. Intramembranous ossification and endochondral ossification are impaired differently between glucocorticoid-induced osteoporosis and estrogen deficiency-induced osteoporosis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 3867, 2018.

ZHANG, R.; KULKARNI, K. A.; KULKARNI, A. P. Oxidation of eugenol by purified human term placental peroxidase. **Placenta**, v. 21, n. 2, p. 234-240, 2000.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8851

E-mail: ccb@ufpe.br
www.ccb.ufpe.br

Ofício nº129/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof. Almir Gonçalves Wanderley
Departamento Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0041/2017

Certificamos que a proposta intitulada **"Eugenol: Estudo do Efeito Neuroprotetor em Modelo Experimental da Doença de Parkinson e Avaliação da Segurança de Uso Pré-Clinico."** registrada com o nº 0041/2017 sob a responsabilidade de **Prof. Almir Gonçalves Wanderley** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle de experimentação animal (concea), e foi aprovada pela comissão de ética no uso de animais (ceua) da universidade federal de pernambuco (UFPE), em reunião de 06/12/2017.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro 2018 a março 2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss e rato Westar
Nº de animais	Camundongo: 20 e Ratos: 244
Peso/Idade	Camundongos 35-40g/60 dias e Ratos 200-300g/90 dias
Sexo	Camundongos: M=10 e F=10 Ratos: M=134 e F=110
Origem	Ratos Bioterio do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Os Camundongos do Bioterio do Departamento de Antibióticos.

Atenciosamente

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente CEUA / CCB-UFPE
CPF: 016.158.158-4