UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

CURSO DE GRADUAÇÃO EM LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLOÓGICAS

NATÁLIA DA SILVA SENA

ESTUDO HISTOLÓGICO DO ÁCIDO ÚSNICO SOBRE OS FÍGADOS DE RATAS WISTAR PRENHES NO PERÍODO DA ORGANOGÊNESE

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

CURSO DE GRADUAÇÃO EM LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NÚCLEO DE BIOLOGIA

NATÁLIA DA SILVA SENA

ESTUDO HISTOLÓGICO DO ÁCIDO ÚSNICO SOBRE OS FÍGADOS DE RATAS WISTAR PRENHES NO PERÍODO DA ORGANOGÊNESE

TCC apresentado ao Curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para conclusão do Componente Eletivo.

Orientador: Noemia Pereira da Silva Santos
Coorientador: Cleopatra Regina da Silva

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2015

Catalogação na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4-2018

S474e Sena, Natália da Silva
Estudo histológico do ácido úsnico sobre os fígados de ratas wistar prenhes no período da organogênese / Natália da Silva Sena. - Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.

26 folhas.; il.

Orientadora: Noemia Pereira da Silva Santos.
Coorientadora: Cleopatra Regina da Silva.

TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV. Licenciatura em Ciências Biológicas, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Liquens. 2. Ácido Úsnico. 3. Toxicidade Reprodutiva. 4. Hepatotoxidade. I. Santos, Noemia Pereira da Silva (Orienadora). II. Silva, Cleopatra Reguba da. II. Título.

615.907 CDD (23.ed.) **BIBCAV/UFPE-086/2015**

NATÁLIA DA SILVA SENA

ESTUDO HISTOLÓGICO DO ÁCIDO ÚSNICO SOBRE OS FÍGADOS DE RATAS WISTAR PRENHES NO PERÍODO DA ORGANOGÊNESE

Trabalho de Conclusão de Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para incremento da Disciplina Eletiva TCC.

Aprovado em: 22/07/2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos
Universidade Federal de Pernambuco

MSc. Cybelle Alves Tavares
Universidade Federal de Pernambuco

Thiers Araújo Campos
Universidade Federal de Pernambuco

Dedicatória

Dedico esse trabalho ao meu pai Geraldo Gomes de Sena (*in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me ajudar a realizar esse sonho e ter me guiado para o caminho certo nos momentos difíceis e de incertezas nesses quatros anos de graduação.

Agradeço a professora Dra. Noemia pela paciência, dedicação e orientação na construção desse trabalho.

Agradeço a futura Dra. Cleópatra por também ter me orientado e me ajudado nesse momento tão especial.

Agradeço a minha família que esteve sempre presente na minha vida e fez eu me tornar o que sou hoje, a minha mãe Juvanilda que sempre me aconselhou em todos os momentos, aos meus irmãos Natielle e Naílson que tornam o meu dia mais feliz e ao meu pai Geraldo (*in memoriam*) que me ajudou e orientou nos três primeiros anos da graduação e que foi o motivo da minha força para continuar a seguir em frente e conseguir realizar esse sonho que é meu e dele, e sei que onde ele estiver estará em festa pela concretização desse sonho.

Agradeço as minhas amigas Ana Patrícia, Elissandra, Marcela e Marília que me deram muita força e me ajudaram em um dos momentos mais difíceis da graduação.

Agradeço ao técnico Silvio por ter me acolhido no laboratório de Bromatologia.

Agradeço o suporte do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq).

Agradeço ao Centro Acadêmico de Vitória por ter me acolhido no curso de graduação e todos os professores que contribuíram com seus ensinamentos para minha formação acadêmica.

RESUMO

O ácido úsnico é um composto de origem natural resultante do metabolismo secundário de liquens, que é a associação simbiótica entre fungos e algas, ele possui propriedades farmacológicas, como antiflamatória, e antibiótica, mas apesar de apresentar essas propriedades seu uso é limitado por causa da sua hepatotoxicidade. No período da gestação, a exposição materna a esse material químico pode causar efeitos no organismo, pois nesse período a maioria dos agentes atravessa facilmente a placenta. Com isso fez-se necessário investigar a toxicologia do ácido úsnico nos fígados de ratas prenhas e suas proles no período reprodutivo para verificar situações que pode ocasionar riscos para a reprodução humana. Os animais experimentais utilizados foram ratos, onde se fez o acasalamento e após a confirmação da gestação as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente no grupo controle e grupo tratado, onde o grupo controle recebeu solução fisiológica e os grupos tratados receberam o ácido úsnico livre por gavagem nas doses de 15 mg/kg e 25 mg/kg de peso corporal e após a gestação, as fêmeas foram sacrificadas, os úteros maternos foram dissecados e os fetos retirados para as análises histológica. Os resultados demonstraram que o ácido úsnico apresentou toxicidade durante a organogênese, onde houve uma redução no número de megacariócitos entre os grupos experimentais e um aumento no número de hepatócitos na dose de 25 mg/kg, esta confirmação nos revela que é importante investigar os efeitos tóxicos de substâncias naturais.

Palavras-chave: Liquens, Ácido Úsnico, Toxicidade Reprodutiva, Hepatotoxidade.

ABSTRACT

The usnic acid is a compound of natural origin resulting from secondary metabolism lichen, which is symbiotic association between fungi and algae, it has pharmacological properties as antiflamatória, and antibiotic but despite having these properties its use it is limited because of its hepatotoxicity. In the period of pregnancy, maternal exposure to this chemical material can cause effects in the body, for in that period most agents readily crosses the placenta. Thus it was necessary to investigate the toxicological potential in the livers of pregnant rats and their offspring in the reproductive period to check situations that can cause risks to human reproduction. Experimental animals were used where it made mating and upon confirmation of pregnancy females were randomly distributed in control and the group treated group, where the control group received saline and the treated groups received the usnic acid by gavage at doses of 15mg/kg and 25mg/kg body weight after pregnancy, females were sacrificed, uteri were dissected maternal and fetal removed for histological analysis. The results showed that the usnic acid showed toxicity during organogenesis, where there was a reduction in the number of megakaryocytes between the experimental groups and an increase in the number of hepatocytes in a dose of 25 mg / kg, this confirmation reveals that it is important to investigate the effects toxic natural substances.

Keywords: Lichens, Usnic Acid, Reproductive Toxicity, Hepatotoxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 LÍQUEN	11
2.2 ÁCIDO ÚSNICO	12
2.3 AVALIAÇÃO DA TOXICOLOGIA REPRODUTIVA	13
3. OBJETIVOS	15
4. METODOLOGIA	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÂO	18
6. CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

O ácido úsnico é um composto de origem natural resultante do metabolismo secundário de liquens, que é a associação simbiótica entre fungos e algas. O ácido úsnico é uma substância caracterizada pela cor amarela amarelada e de baixa solubilidade em água (10 mg/100 mL a 25 ºC). Esse ácido é considerado um dos mais importantes metabólitos liquênicos biologicamente ativos, podendo representar mais de 5% do talo seco do líquen (MULLER, 2001).

Na literatura encontramos várias descrições sobre as propriedades farmacológicas do ácido úsnico, essas propriedades farmacológicas podem ser: antibiótica (COCCHIETO; SKERT; NIMIS, 2002), antiflamatória (VIJAYAKUMAR et.al., 2000), antineoplásica (SANTOS et. al., 2006; RIBEIRO-COSTA et. al., 2006; BRISDELLI et. al., 2013), antiviral (SOKOLOV, et. al., 2012), antioxidante (KOHLHARDT-FLOEHR et. al., 2010; BEHERA; MAHADIK; MOREY, 2012), cicatrizante (BRUNO et. al., 2013) e moluscicida (MARTINS, 2013). Devido a essa grande variedade de propriedades farmacológicas o número de pesquisas cientificas sobre a eficácia do ácido úsnico cresceu muito, pois dados do banco de pesquisa científica internacional revelam que numa média de quatros anos de estudo sobre o esse ácido o número de artigos publicados passou de cinco artigos em 1974 para cinquenta e um artigos publicados no ano de 2013. Mas quando fazemos uma comparação com as pesquisas cientificas relacionadas à toxicidade, as publicações dos artigos não acompanham o ritmo de pesquisas que demonstra os potencial tóxico que essa substância pode promover ao organismo (SILVA, 2011).

A toxicidade de uma substância a um ser vivo pode ser considerada como a capacidade de causar dano grave ou morte (BARROS; DAVINO, 2008). O estudo da avaliação da toxicologia reprodutiva tem como objetivo esclarecer os efeitos adversos produzidos pela exposição de drogas, sejam elas naturais ou sintéticas, no organismo que está se desenvolvendo, pois de acordo com a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição. São avaliados nos ensaios realizados em animais, nos estudos pré-clínicos da toxicidade reprodutiva, a fertilidade, o acasalamento, o desenvolvimento embrio-fetal, o parto e o desenvolvimento pós-natal dos descendentes até a

maturidade reprodutiva (LEMONICA et al., 2008). Na organogênese, que é o período da formação dos órgãos, esses efeitos podem provocar anormalidades no organismo que está em desenvolvimento (BERNADI, 2003). O estudo de anomalias e malformações que são provocadas por perturbações durante o desenvolvimento embrionário e fetal são de responsabilidade da teratologia, onde esses efeitos além de ser malformações também podem ser deformidades e displasias (HANSEN e YANKIWITZ, 2002). A Malformação não está limitada apenas na formação anormal dos tecidos, mas também anormalidades químicas, e estas alterações podem ser causadas pela ação direta de um agente tóxico sobre o feto ou através de ação sobre o organismo materno.

O mecanismo de ação do ácido úsnico não está completamente elucidado, mas Pramyothin et al., 2004 constataram que ele age alterando a integridade da membrana celular permitindo a liberação de enzimas hepatoespecíficas, principalmente transaminases, além de causar destruição da função mitocondrial exibindo perda do controle da respiração celular e na síntese de ATP e consequentemente morte celular. Estudos *in vitro*, demonstram que hepatócitos isolados de ratos tratados com diferentes concentrações de ácido úsnico (5 μM e 10 μM) apresentaram quase 100% de necrose com a redução considerável dos níveis de ATP e inibição da respiração celular, levando ao aumento da produção de oxigênio reativo, em forma de radical livre, pela cadeia transportadora de elétrons causando a morte celular (HAN, et al, 2004).

Foi relatado nos Estados Unidos, que o ácido úsnico foi um dos princípios ativos de um suplemento chamado Lipokinetix®, e os indivíduos que consumiram esse suplemento que continha usnato de sódio apresentaram danos hepatocelular (FRAVEAU et.al., 2002). Dados afirmam que estas pessoas apresentaram falência aguda do fígado (NEFF et al., 2004). Também foi reportado que pacientes desenvolveram hepatotoxicidade severa após consumirem durante três meses, três cápsulas por dia de UDP-1 (que contêm 150 mg de ácido úsnico, 525 mg de carnitina e 1050 mg de piruvato de cálcio). Ainda foram relatados que pacientes desenvolveram falência hepática fulminante e foi necessário o transplante do fígado. As análises histopatológicas revelaram infiltrados linfocitoplasmático e áreas de necrose no fígado dos pacientes usuários de UDP-1(SANCHEZ et al., 2006).

Uma unidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) chamada de Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia (GESEF) publicou em março de 2010, no Brasil o “Guia para a Condução de Estudos Pré-clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos”, esse documento orienta os estudos pré-clínicos de segurança para o desenvolvimento de novos medicamentos, e foi fundamentado em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos dos Estados Unidos Alimentação e Administração de Drogas (FDA) e Europa Agência Europeia de Medicamentos (EMEA), Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH), Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico. (OECD), Instituto Nacional do Câncer (NCI) e Organização Mundial de Saúde (WHO), visando a uma padronização com a regulamentação internacional (ANVISA, 2010).

É importante investigar as ações tóxicas de compostos naturais em modelos animais porque a partir disto, vamos compreender quais os efeitos que essas substâncias podem acarretar ao ser humano quando indicadas como um potencial fármaco na elaboração de medicamentos. Além disso, esses estudos também vão contribuir para a expansão do conhecimento que é necessário para avaliar a toxicidade de novos produtos naturais, já que eles podem ser usados em novos fármacos para tratamento de doenças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LÍQUEN

Líquen é o resultado da simbiose de um micobionte com um fotobionte, ele está amplamente distribuído no ambiente terrestre e prefere ambientes pouco ou não degradados, substratos específicos e estáveis, possui crescimento lento e suas comunidades podem levar décadas para se estabelecerem em um substrato novo (MARCELLI, 1987). Os líquens são classificados em crostosos, foliosos, fruticosos, filamentosos e dimórficos (RAVEN; EVERT; EICORHHN, 2010). A estrutura do talo liquênico é composta por sobreposição do micobionte e fotobionte, onde o primeiro é encontrado nas extremidades do córtex protegendo o fotobionte do ressecamento. Além desta proteção, os ácidos liquênicos pigmentados aumentam a opacidade do córtex superior, reduzindo a incidência de luz sobre a camada de alga e/ou cianobactéria, servindo assim como um filtro solar, permitindo que o fotobionte se desenvolva em ambientes com alta incidência de luz. Nesta relação simbiótica o fotobionte fornece vitaminas, nitrogênio (simbiose com cianobactéria) e substâncias orgânicas necessárias ao desenvolvimento do micobionte (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2010).

Desta associação entre micobionte e fotobionte são produzidos metabólitos intracelulares e extracelulares, classificados de acordo com sua localização no talo. Os produtos intracelulares são resultantes do metabolismo primário onde são sintetizados carboidratos, aminoácidos, proteínas, vitaminas, pigmentos (clorofila, xantofila e carotenos), estes são frequentemente solúveis em água facilitando assim sua extração. Os metabólitos extracelulares são compostos resultantes de seu metabolismo secundário, estes denominados substâncias liquênicas, tendo como exemplos os ácidos úsnico, protocetrárico, fumarprotocetárico, salazínico, lecanórico, etc. (CULBERSON, 1972; NASH III, 1996). Estes produtos extracelulares são os responsáveis pela maioria das atividades biológicas e ambientais dos liquens (MULLER, 2001).

2.2 ÁCIDO ÚSNICO

O ácido úsnico é um composto de origem natural resultante do metabolismo secundário de líquens e é caracterizado por ser uma substância com pigmentação amarelada e baixa solubilidade em água, (INGÓLFSDÓTTIR, 2002; COCCHIETTO et al., 2002). Ele é considerado um dos mais importantes metabólitos liquênicos biologicamente ativos e pode apresentar mais de 5% do talo seco do líquen (MULLER, 2001).

O principal papel biológico do ácido úsnico na natureza é o de antibiótico. As primeiras avaliações sobre a ação antibacteriana desse ácido datam da década de 50 e as investigações nos últimos anos tem ampliado o conhecimento desse metabólito liquênico como antibiótico (COCCHIETTO et al, 2002).

A atividade antimicrobiana do ácido úsnico foi avaliada em combinação com cinco antibióticos em um estudo *in vitro*, os cinco antibióticos foram: clindamicina, eritromicina, gentamicina, levofloxacina e oxacilina e ocorreu um aumento na atividade antibacteriana com a ação sinérgica do ácido úsnico com gentamicina, clindamicina, oxacilina e eritromicina, enquanto efeito antagônico foi observado com a levofloxacina. Segatore et al., 2012 dizem que esses resultados confirmam a atividade antimicrobiana do ácido úsnico e sugere que essa substância pode ser um bom candidato para o desenvolvimento de novas combinações de medicamentos ou agentes antimicrobianos.

Um estudo sobre ação anti-inflamatória do ácido úsnico em ratos Wistar com edema de pata, revelou uma significante redução dos edemas com a utilização de uma dose de ácido úsnico de 100mg/Kg de peso corpóreo, quando comparado com um fármaco padrão na mesma dose, esse fármaco possui referência como anti-inflamatório e é chamado de ibuprofeno. Nesse estudo de edema de pata agudo, a redução foi de 0,82 mL (controle) para 0,55 e 0,47 mL (ácido úsnico e ibuprofeno), com a ajuda desses resultados, foi sugerido que o mecanismo de ação do ácido úsnico pode provocar uma inibição das prostaglandinas semelhante a outras drogas anti-inflamatórias (VIJAYAKUMAR et. al., 2000).

A atividade antitumoral do ácido úsnico foi estuda em camundongos Swiss frente ao tumor experimental sarcoma-180 e constatou-se que após a utilização do ácido obteve-se uma inibição de 43% no tumor e uma houve uma redução da

proliferação celular do carcinoma epidermóide de laringe (RIBEIRO-COSTA et al., 2006; SANTOS et al. 2006).

Foram utilizadas células de carcinoma de pulmão humano (NCI-H 292) na investigação da ação antiproliferativa do ácido úsnico em suspensão e contido dentro das nanocápsulas poliméricas e onde os resultados exibiram uma atividade citotóxica considerável tanto para o composto em suspensão quanto para encapsulado (SANTOS et.al., 2006)

Uma possível utilização do ácido úsnico em preparações na promoção da cura ou antienvelhecimento foi observada em ensaios de cicatrização de feridas, onde foi estimulado o fechamento das monocamadas de queratinócitos apresentando atividade bacteriostática e antioxidante na região lesionada (BRUNO et. al., 2013).

2.3 AVALIAÇÃO DA TOXICOLOGIA REPRODUTIVA

Os estudos pré-clínicos da toxicidade reprodutiva consistem em ensaios realizados com animais e tem o propósito de verificar o potencial que uma substância química tem de provocar efeitos adversos sobre um organismo que está no processo reprodutivo. Esses efeitos adversos sobre a organogênese, período da formação dos órgãos como já citado, pode ocasionar malformações no organismo em desenvolvimento, com isso faz-se necessário avaliar a fase da formação dos órgãos, pois caso essa avaliação não aconteça, poderá haver um comprometimento com o desenvolvimento pós-natal do organismo. A reprodução em mamíferos é um processo delicado onde o organismo está susceptível a agentes químicos ou a interferências ambientais e essa exposição pode provocar diversas alterações no desenvolvimento do organismo, como malformações externas, mutações ou até mesmo a morte (LEMONICA et. al., 2008).

Em um recente estudo de ensaios preliminares da toxicidade reprodutiva do ácido úsnico de *Cladonia substellata em* ratas *Wistar* no período inicial da organogênese, demonstrou a presença *de s*inais tóxicos na prole de fêmeas prenhas e foi visualizada uma redução na massa corpórea das fêmeas prenhas tratadas, quando comparadas ao grupo controle. Nas proles do grupo tratado, foi

observado apenas 76% de fetos viáveis, sendo que 24% destes, não prosseguiram o desenvolvimento, e foram portanto, considerados não viáveis. Nesse mesmo estudo também foi visualizado uma interrupção no desenvolvimento da prole, além da presença de malformações. Estes resultados revela a necessidade da realização de mais estudos comparativos da toxidez reprodutiva do ácido úsnico livre (SILVA, 2011).

É de grande importância a avaliação de substâncias naturais que são biologicamente ativas já que elas tem a capacidade de provocar efeitos nocivos para um organismo, então a partir disso se faz necessário investigar o potencial toxicológico do ácido úsnico no período reprodutivo para que possamos determinar situações que podem ocasionar potenciais riscos para a reprodução humana.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar a toxicologia do ácido úsnico no período reprodutivo nos fígados das proles do ponto de vista morfológico após o tratamento do ácido úsnico livre no período da organogênese.

Objetivos Específicos:

- Analisar após o tratamento do ácido úsnico livre o peso do fígado dos fetos das fêmeas tratadas nas doses de 15mg/kg e 25mg/kg;
- Avaliar as alterações histomorfométricas do fígado dos fetos.

4. METODOLGIA

Substância liquênica

Os materiais liquênicos (*Cladonia substellata*) foram coletados no Município de Alhandra, Paraíba. O ácido úsnico foi isolado, purificado e caracterizado através de colaboração já firmada com a Profa. Dra. Nely Kika Honda, do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química da UFMS.

Ensaios *in vivo*

Animais experimentais

Os animais utilizados foram ratos (Wistar) fêmeas e machos - com idade aproximadamente 70 dias e peso médio de 200 a 350g, provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição. Os animais ficaram mantidos à temperatura ambiente a 28°C ± 2°C, sob ciclo dia/noite natural (12h luz e 12h escuro), com livre acesso de água e alimento durante o experimento. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal, Processo n° 23076.004552/2010-99.

Ciclo estral – Acasalamento

Inicialmente as fêmeas foram submetidas ao estudo do ciclo estral no intuito de se determinar o período fértil. Foram coletadas células da parede vaginal e produzidas lâminas pelo método de estiraço, e consequentemente submetida à coloração, utilizando o corante de SHORR. Através das análises microscópicas foi identificado o período de ovulação das fêmeas, denominado estro. Após a confirmação do período de ovulação. As fêmeas foram pareadas com machos (2:1) *overnigth,* o acasalamento foi confirmado com a presença do "*plug*" (massa esbranquiçada de espermatozóides na abertura vaginal) e pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. As primeiras 24 horas após a confirmação do acasalamento foram consideradas como dia zero (D0) de gestação, onde cada fêmea foi pesada.

Análise toxicológica reprodutiva

As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente nos grupos controle e tratados: Grupo I, II, III (n=6). Os animais foram tratados por via oral a partir do 6 ° ao 14° dia de gravidez. Os animais do grupo controle receberam 1,0 mL de solução fisiológica e os dos grupos tratados receberam o ácido úsnico livre nas doses de 25 mg/kg e 15 mg/kg de peso corporal. O ácido úsnico foi diluído em solução tamponada pH 7.4. As fêmeas foram eutanasiadas por overdose de anestésico Urethane (1,25 g/kg). Os úteros maternos foram dissecados, e após a abertura do mesmo, os fetos foram retirados e analisados no sentido crânio-caudal, para avaliar a presença de malformações externas. Em seguida, os fetos e suas placentas foram pesados.

Análise Visceral dos fetos

Para registro de anomalias viscerais na prole foi avaliado o fígado de cada ninhada. Após o sacrifício, os fígados foram dessecados e pesados, posteriormente submetidos a análises histopatológicas. Os tecidos foram mantidos em solução tamponada de formalina a 10% até inclusões em parafina. Cortes (4 µm) de cada amostra de tecido foram corados com Kits de Tricômico de Manson da EASYPATH® e posteriormente analisados por microscopia óptica (Olympus BH-2, Japan).

Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). A significância estatística foi determinada por análise de variância one-way ANOVA seguido de testes da Turkey. $P < 0,05$ análises significantes. Todas as análises foram realizadas utilizando software Prisma (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, versão 5.01).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que obtivemos depois da pesquisa indicam que o tratamento com o ácido úsnico durante o período da organogênese ocasionou alterações nos grupos analisados. No decorrer da pesquisa todas as fêmeas tanto do grupo controle quanto do grupo tratado ficaram prenhas e depois da fertilização nenhuma morte foi registrada, além disso não foi observado perda de pelos e vocalização.

Aconteceram algumas reduções no peso médio dos fígados dos fetos das fêmeas tratadas com ácido úsnico, onde foi evidenciada na dose de 15mg/kg uma pequena redução (0,34±0,02g) quando comparado ao grupo controle, que foi (0,5±0,02g), já na dose de 25mg/kg houve uma relevante diminuição (0,2± 0,05g) ao compararmos com o grupo controle e com o grupo tratado com a dose de 15mg/kg.

Tabela 1. Efeito do ácido úsnico sobre os parâmetros fetais.

Variáveis	**Grupo Controle**	**Grupo Tratado 15/mg/kg**	**Grupo Tratado 25/mg/kg**
Peso Feto(g)	5,7 ± 0,3	4,6 ± 0,1*	3,5 ± 0,1***
Peso Fígado(g)	0,5 ± 0,02	0,34 ± 0,02*	0,2 ± 0,05***
Reabsorção Fetal	1,1 ± 0,4	3,5 ± 0,5*	5 ± 1***

Dados expressos com média ± desvio padrão. ANOVA-Turkey. *p<0,05, ***p<0,001 comparado com o grupo controle.

Com relação ao peso médio dos fetos podemos observar através da tabela, que também aconteceu algumas reduções, onde o peso do feto tratado com a dose de 15mg/kg foi de 4,6 ± 0,1 quando comparado com o grupo controle (5,7 ± 0,3). Já o grupo tratado com a dose de 25mg/kg apresentou 3,5 ± 0,1, indicando assim que existiu uma maior redução quando comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com a dose de 15 mg/kg.

Em relação a análise histológica do fígado do grupo de fetos das fêmeas tratados com ácido único na dose de 15mg/kg podemos observar através da figura 1 uma redução não significativa na quantidade de megacariócitos quando comparamos com o grupo controle e para a dose de 25mg/kg os megacariócitos apresentaram uma redução significativa por campo analisado, quando comparado ao grupo controle. Na contagem de megacariócitos houve uma redução na média dessas células, onde a dose de 15mg/kg representou 47,83% quando comparado ao grupo controle e a dose de 25mg/kg apresentou 70,6% comparado ao grupo controle.

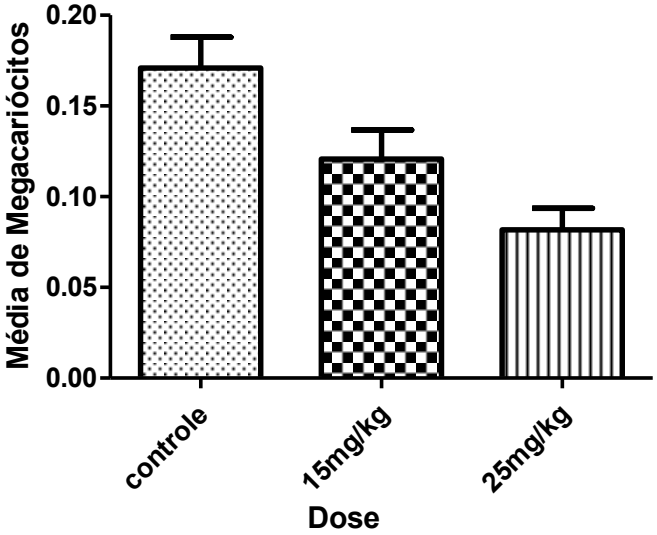

Figura 1. Análise da média dos megacariócitos nos grupos experimentais. Dados expressos com média ± desvio padrão. ANOVA-Turkey. ***p<0,001 tratamento de 25mg/kg comparado ao grupo controle.

Na análise morfológica dos fígados dos fetos obtidos das fêmeas do grupo controle foi observado padrões de normalidade, onde foi visualizado a presença de megacariócitos entre os cordões hepáticos, já no grupo tratado com 15mg/kg, foi observado à presença de células sanguíneas que estavam em diferentes estágios de desenvolvimento, em relação aos megacariócitos foi observado uma redução significativa por campo analisado, quando comparado ao grupo controle. Para o

fígado dos fetos tratados com ácido úsnico na dose de 25mg/kg os cordões de hepatócitos mostravam-se significativamente em maior quantidade quando comparado ao grupo controle.

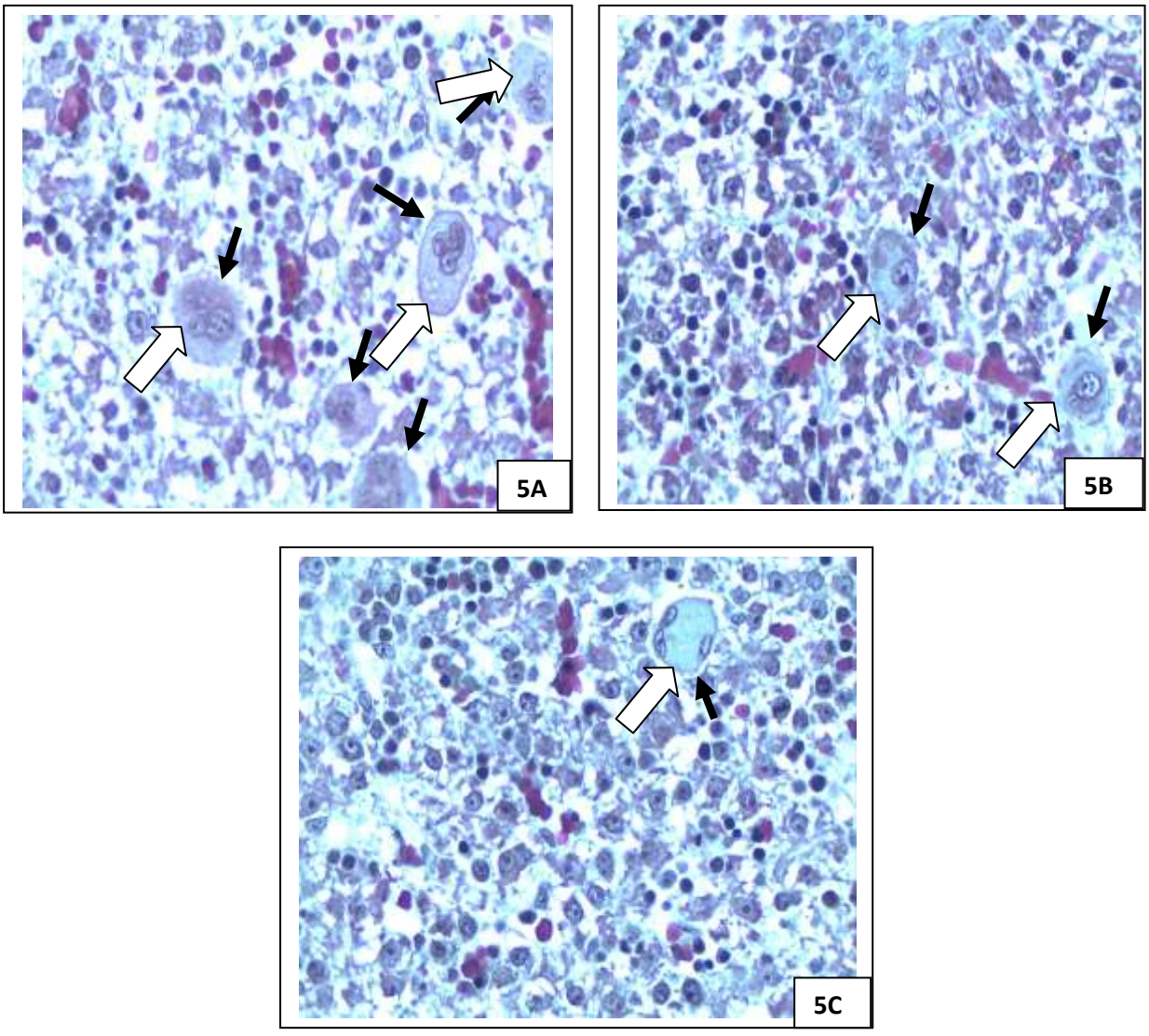

Figura 2. Fotomicrografia do fígado da prole dos grupos controle e tratado: Visualização dos megacariócitos (seta). **5A**. Grupo controle **5B**. Grupo tratado 15mg/kg onde é visualizado uma redução não significativa na quantidade de megacariócitos. **5C**. Grupo tratado 25mg/kg onde é observado uma expressiva redução na quantidade de megacariócitos quando comparado ao grupo controle. Coloração Tricômico de Manson. Aumento 400x.

A partir desses resultados percebemos que o ácido úsnico exibiu toxicidade, pois a dose de 15mg/kg apresentou redução na quantidade de megacariócitos quando comparado com o grupo controle, já a dose de 25mg/kg apresentou toxicidade ainda maior, pois a redução do número de megacariócitos foi mais significativa do que na dose de 15 mg/kg, e aconteceu uma alteração no processo de formação dessas células. A alteração do processo de formação dos megacariócitos pode provocar uma deficiência na cascata da coagulação inicial do organismo (SI-TAYEB, et al., 2010).

Com relação a histomorfometria do fígado da prole, o número total de hepatócitos quando administrado a dose de 15mg/kg não demostrou alteração significativa (33,2±9,9) na média de células quando foi comparado ao grupo controle que obteve a média de (33,4±8,6), e isso corresponde a normalização pelo controle que é de 100% um valor de 99,2% para dose 15mg/kg. Já para a dose de 25mg/kg foi visualizado um aumento significativo no número médio de hepatócitos (41,6±6) o que caracteriza 24,3% de aumento quando comparado ao controle (Figura 3).

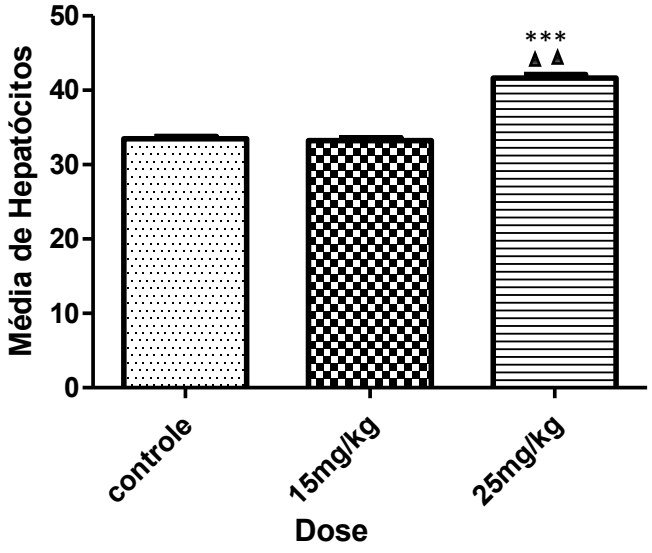

Figura 3. Análise da média dos hepatócitos nos grupos experimentais. Dados expressos com média ± desvio padrão. ANOVA-Turkey. **p<0,001 tratamento de 15mg/kg comparado ao grupo tratado com 25mg/kg, ***p<0,001 tratamento de 25mg/kg comparado ao grupo controle.

Substâncias naturais ou sintéticas atravessam a placenta e penetram na circulação do feto através da via umbilical e passam pelo fígado do feto antes de atingir o coração e a circulação sistêmica (BERNARDI, 2003). Algumas substâncias já foram comprovadas quanto a passagem pela barreira placentária, uma delas é o etanol, onde demonstrou um atraso no desenvolvimento hepático normal, ou seja, aconteceu uma redução de hepatócitos, quando comparado com o grupo controle (DOMINGUES et al.,2009; SANTOS et al., 2010). Mas o número de fetos de fêmeas tratadas com o etanol manteve-se dentro da normalidade e isso não aconteceu em nossos estudos, porque ocorreu uma diminuição de fetos por fêmea, e isso pode representar uma adaptação ou uma reposta a toxicidade produzida pelo ácido úsnico durante o período da organogênese.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Enfim, a pesquisa realizada demonstrou que o ácido úsnico apresenta toxicidade no período da formação dos órgãos (organogênese) e também demonstra que a dose de 25mg/kg foi a mais tóxica. Isso nos indica a importância de investigar os efeitos tóxicos que são produzidos por substâncias naturais, a fim de alertar quanto ao cuidado da sua utilização ou indicação com potencial fármaco.

REFERÊNCIAS

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. **Fundamentos de Toxicologia**. Editora Atheneu, ed. 3 p. 59 - 71, 2008.

BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Editora Guanabara Koogan, ed. 2, p. 566-574, 2003.

BEHERA, B. C.; MAHADIK N.; MOREY M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. **Pharmaceutical Biology**. v. 50 p. 968–979, 2012

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) - **Guia para a Condução de Estudos Não-clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**. Março de 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 10 dez. 2013.

BRISDELLI, F.; PERILLI M.; SELLITRI D.; PIOVANO M.; GARBARINO J. A.; NICOLETTI M.; BOZZI A.; AMICOSANTE G.; CELENZA G. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An In Vitro Study. **Phytotherapy Research** v.27, p. 431–437, 2013.

BRUNO, M.; TRUCCHI B.; BURLANDO B.; RANZATO E., MARTINOTTI S.; AKKOL E. K.; SUNTAR I.; KELES H.; VEROTTA L. (+)(-)Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2013.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P.L. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 137-149, 2002.

CULBERSON, C. F. Inproved conditions and new data for the indication of lichen products by standrdized thin layer-chromaographic method.
Journal of Chromatography. v. 72, p. 1113-1125, 1972.

DOMINGUES J. A.; TOLEDO M. T.; MORAES S. G. Análise Histomorfológica do fígado materno e fetal deratas prenhes desnutridas submetidas à exposição ao etanol. ***Revista* da *Faculdade* de *Ciências* Médicas**, Sorocaba**,** v. 11, n.3 p. 9 – 17, 2009.

FRAVEAU U.J.; RYU T; BRAUNSTEIN M. L. G.; ORSHANSKY G.; PARK S. S.; CPPDY G. L.; LOVE L. A.; FONG T. L., Severe hepatoxicity associated with the dietary suplement lipokinetix, **Annals of Internal Medicine**. v.136, p.590-595, 2002.

M. L. G.; ORSHANSKY G.; PARK S. S.; CPPDY G. L.; LOVE L. A.; FONG T. L. Severe hepatoxicity associated with the dietary suplement lipokinetix, **Annals of Internal Medicine**. v.136, p.590-595, 2002.

HAN, D.; MATSUMARU, K.; RETTORI, D.; KAPLOWITZ, N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 439-451, 2004.

HANSEN, W.F.; YANKIWITZ, Therapy for medical discords during pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology,** v.45, p.136-152, 2002.
INGÓLFSDÓTTIR, K. Molecules of Interest Usnic Acid. **Phytochemistry**, v. 61, p. 729-736, 2002.

KOHLHARDT-FLOEHR, C.; BOEHM F.; TROPPENS S.; LADEMANN J.; TRUSCOTT T. G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v.101 p. 97–102, 2010.

LEMONICA, I. P.; OGA, S., CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. Editora Atheneu, v. 3, p. 59-71, 2008.

MARCELLI, M.P. **Ecologia liquênica nos manguezais do sul-sudeste brasileiro, com especial atenção ao de Itanhaém**. 1987. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.1987.

MARTINS, M.C.B. **Aplicações Biotecnológicas de Compostos Obtidos dos Liquens**. 2013. Tese de Doutorado. Recife: Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 9-16, 2001.

NASH III, T.H. **Lichen Biology**. Cambridge University. Press. ed. 1, 303 p., 1996.
NEFF, G. W.; REDDY, K. R.; DURAZO, F. A.; MEYER, D.; MARRERO, R.; KAPLOWITZ, N. Severe hepatotoxicity associated with the use of weight loss diet supplements containing ma huang or usnic acid. **Journal of Hepatology**, v. 41, p. 1062-1064, 2004.

PRAMYOTHIN, P.; JANTHASOOT W.; PONGNIMITPRASERT N., PHRUKUDOMC S.; RUANGRUNGSI N. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria, **Journal Ethnopharmacol,** v.90 p. 381-387, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN E. S. **Biologia Vegetal**. Editora Guanabara Koogan LTDA. v. 7, p. 306, 2010.

RIBEIRO-COSTA, R.M.; ALVES, A.J.; SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.; GONÇALVES, E.C.P.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of Microencapsulation**, London, v.21, n.4, p.371-384, 2006.

SANCHEZ, W.; MAPLE J. T.; BURGART L. J.; KAMATH P. S. Severe hepatoxicity associated with use of a dietary suplement containig usnic acid, **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, p. 541-544, 2006.

SANTOS, N.P.; NASCIMENTO S.C.; WANDERLEY M.S.O.; TELLES N.; CASTRO, C.M.M B.; PEREIRA E.C.; SILVA N.H.; HONDA N.K.; SANTOS-MAGALHÃES N.S.; Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.64 p.154–160, 2006.

SANTOS A. M. R.; MOTTA C. M.; SOUZA E. C. A.; MORAES S. G. Análise histomorfológica do fígado de ratas e de seus fetos expostos ao álcool durante a gestação ***Revista* da *Faculdade* de *Ciências* Médicas Sorocaba,** v.12, n.4, p.10-14, 2010.

SEGATORE, A. B.; BELLIO P.; SETACCIA D.; BRISDELLI F.; PIOVANOB M.; GARBARINOB J. A.; NICOLETTI M.; AMICOSANTEA G.; PERILLI M.; CELENZAA, G. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. **Phytomedicine** v.19 p.341-347, 2012.

SILVA, C. R. **Avaliação da Embriotoxicidade de Ácido Úsnico Obtido de *Cladonia Substellata* frente às ratas prenhez Wistar**. 2011. Monografia, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

SILVA, C.R. **Efeito do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o desenvolvimento embrionário em fêmeas Wistar.** 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia). Recife: Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

SI-TAYEB K.; LEMAIGRE F. P.; DUNCAN S. A. Organogenesis and Development of the Liver. **Developmental Cell Review** ed. 18 p 1-15.2010

SOKOLOV, D. N.; ZARUBAEV V. V.; SHTRO A. A.; POLOVINKA M. P.; LUZINA O. A.; KOMAROVA N. I.; SALAKHUTDINOV N. F.; KISELEV O. I. Anti-viral activity of (-)/(+) usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 22 p. 7060–7064, 2012.

VIJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; REDDY, M.K.; PARVATHAVARTHINI, S.; KUNDU, A B; SUKUMAR, E. Anti-inflamtory activity of (+) –unisc acid. **Fitoterapia***,* v. 71, p 564-566, 2000.