



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia

LUCIANO SOUZA DE LIMA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO (*O*-Metil-*N*-(2,6-Diidroxibenzoil)-tiramina (RIPARINA III) DA PLANTA *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) SOBRE A MORFOGÊNESE DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM EMBRIÃO DE *Gallus gallus*

RECIFE, 2017

LUCIANO SOUZA DE LIMA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO (*O*-Metil-*N*-(2,6-Diidroxibenzoil)-tiramina (RIPARINA III) DA PLANTA *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) SOBRE A MORFOGÊNESE DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM EMBRIÃO DE *Gallus gallus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

ORIENTADORA
Prof^a. Dr^a. Eliete Cavalcanti da Silva

CO-ORIENTADORA
Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros

RECIFE, 2017

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lima, Luciano Souza de

Avaliação do efeito do composto (O-Metil)-N-(2,6-Didroxibenzoil)-tiramina (Riparina III) da planta *Aniba riparia* (Nees) Mez (Laureaceae) sobre a morfogênese do sistema nervoso central em embrião de *Gallus gallus* / Luciano Souza de Lima- Recife: O Autor, 2017.

47 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Eliete Cavalcanti da Silva

Coorientadora: Paloma Lys de Medeiros

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Morfotecnologia, 2017.

Inclui referências e anexo

1. Morfogênese 2. Galinhas 3. Sistema Nervoso Central I. Silva, Eliete Cavalcanti da (orientadora) II. Medeiros, Paloma Lys (coorientadora) III. Título

571.833

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-282

LUCIANO SOUZA DE LIMA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO (*O*-Metil-*N*-(2,6-Diidroxibenzoil)-tiramina (RIPARINA III) DA PLANTA *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) SOBRE A MORFOGÊNESE DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM EMBRIÃO DE *Gallus gallus*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 25/05/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Eliete Cavalcanti da Silva (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Ivone Antônia de Souza (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa Roberta, que me auxiliou muito na confecção deste sonho, sendo a minha principal base pessoal e profissional durante este período. Sem ela, provavelmente, não existiria êxito.

AGRADECIMENTOS

À Santíssima Trindade por estar sempre junta ao meu lado nas horas mais difíceis do projeto, sempre me abençoando e me levando às decisões certas.

Ao Santo Expedito, que está sempre intercedendo à Santíssima Trindade junto aos meus anseios e expectativas pessoais e profissionais.

À minha querida mãe Eva, que mesmo não possuindo domínio de causa sobre o projeto, sempre estava me apoiando e me incentivando a continuar.

À Coordenadora e Vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia – UFPE, Profa. Dra. Sônia Leite e Prof. Dr. Jeymesson Raphael Vieira respectivamente, que tiveram a paciência e o profissionalismo exemplar para comigo e que muito me auxiliaram na confecção deste trabalho.

Às Profas. Dra. Eliete Cavalcanti e Dra. Paloma Medeiros, orientadora e coorientadora respectivamente, que compartilharam seus conhecimentos, possibilitando chegar ao final de cada etapa deste estudo.

À Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, por ceder o espaço e os equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

À empresa que disponibilizou os ovos e também a seus funcionários que entregaram os mesmos para nós.

À Profa. Lúcia Pires, do Departamento de Nutrição da UFPE, que muito me ajudou na confecção da análise estatística.

À Técnica de Laboratório Silvânia, do departamento de Patologia da UFPE, que me auxiliou na confecção das preparações embrionárias de *Gallus gallus*.

Aos meus colegas de Mestrado pelo auxílio e a todos que de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse realizado com êxito.

*“Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z.
O trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca
fechada ”*

Albert Einstein

RESUMO

INTRODUÇÃO: Embriões de *Gallus gallus (domesticus)* são preferidos para avaliação de efeitos teratogênicos de produtos químicos ou naturais, pois nos primeiros estágios de desenvolvimento apresentam-se muito suscetíveis à ação de agentes tóxicos, podendo-se alterar o desenvolvimento embrionário normal.

OBJETIVO: Avaliar o efeito do composto Riparina III sobre a morfogênese do sistema nervoso central em embrião de *Gallus gallus*.

MATERIAL E MÉTODOS: Os ovos com um dia de fertilizados foram incubados em uma chocadeira a uma temperatura de 37,5°C e 60 ± 5% de humidade relativa durante 24 horas. Nos ovos do grupo controle foram injetados 0,1 ml de salina tamponada (PBS, pH 7,0) e nos do grupo experimental foram injetados com Riparina III nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL. Os ovos foram fechados com fitas adesivas e a incubação continuou durante mais 24 horas. Posteriormente, os ovos foram, então, reabertos e os embriões dissecados, com retirada das membranas embrionárias e processados histologicamente para análise morfológica e morfométrica.

RESULTADOS: Identificamos embriões de ave com desenvolvimentos nos estágios de nove a doze de acordo com a classificação de Hamburger e Hamilton (1951). Comparado com o grupo controle, a largura do tubo neural dos embriões foi modificada com todas as concentrações de Riparina III. O comprimento dos pares de somitos mais largos resultou das concentrações de Riparina III de 50 e 100 µg/mL.

CONCLUSÃO: Embriões de *Gallus gallus* expostos a Riparina III nas concentrações de 50 e 100 µg/mL apresentaram aumento no comprimento dos somitos quando comparados com o grupo controle. Em relação à largura do tubo neural, o uso de Riparina III variou a estrutura independente das concentrações estudadas (25, 50 e 100 µg/mL).

PALAVRAS-CHAVE: *Aniba Riparia*. Depressão. Riparina III. Embrião de galinha. Defeito do tubo neural.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Embryos of *Gallus gallus (domesticus)* are preferred for evaluation of the teratogenic effects of chemical or natural products, since in the early stages of development they are very susceptible to the action of toxic agents, being able to alter the normal embryonic development.

AIM: To evaluate the effect of Riparin III on the central nervous system morphogenesis in the *Gallus gallus* embryo.

MATERIAL and METHODS: One day fertilized eggs were incubated in a brooder at 37.5°C and 60 ± 5% relative humidity for 24 hours. In the eggs of the control group, 0.1 ml of buffered saline (PBS, pH 7.0) were injected and in the experimental group were injected with Riparin III at concentrations of 25, 50 and 100 µg / mL. The eggs were closed with adhesive tapes and the incubation continued for another 24 hours. Subsequently, the eggs were then reopened and the embryos dissected, with removal of the embryonic membranes and processed histologically for morphological and morphometric analysis.

RESULTS: We identified bird embryos with development in stages from nine to twelve according to the classification of Hamburger and Hamilton (1951). Compared with the control group, the width of the neural tube of the embryos was modified with all concentrations of Riparin III. The length of the broader somite pairs resulted from the concentrations of Riparin III of 50 and 100 µg/mL.

CONCLUSION: Embryos of *Gallus gallus* exposed to Riparin III at concentrations of 50 and 100 µg/mL presented increase in the somites length when compared to the control group. Regarding the width of the neural tube, the use of Riparin III varied the independent structure of the studied concentrations (25, 50 and 100 µg/mL).

KEY WORDS: *Aniba Riparia*. Depression. Riparin III. Chicken embryo. Neural Tube Defect.

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Constituição do ovo de galinha | 17 |
| Figura 2. Clivagem e formação do epiblasto no embrião de galinha | 18 |
| Figura 3. Desenvolvimento do Tubo Neural e Mesoderme no Embrião de Galinha | 19 |
| Figura 4. Desenvolvimento embrionário de uma galinha | 20 |
| Figura 5. Semana gestacional <i>versus</i> anomalias congênitas | 21 |
| Figura 6. <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez | 24 |
| Figura 7. Estrutura química da Riparina III | 26 |
| Figura 8. Ovos selecionados para grupo controle (PBS) e grupo experimental nas concentrações 25 e 50 μ g/ml de Riparina III | 30 |
| Figura 9. Foto da chocadeira automática (Marca: NELIPE) para a incubação dos ovos | 31 |
| Figura 10. Ovo aberto indicando local do disco embrionário área circundada em vermelho | 32 |
| Figura 11. Embriões lavados com PBS em placas de petri para remoção do excesso de vitelo. G c/ PBS = grupo controle; G25 = dose de 25 μ g/ml de Riparina III; G50 = dose de 50 μ g/ml de Riparina III; G100 = dose de 100 μ g/ml de Riparina III | 32 |
| Figura 12. Desidratação em série alcoólica e diafanização em xilol dos embriões | 33 |
| Figura 13. Exemplo de mensuração da largura do tubo neural (μ m): círculo vermelho. Embrião no estágio 10 H.H do grupo experimental de RIP50. Area = área; Perim. = perímetro; Angle= ângulo; Length = comprimento | 34 |
| Figura 14. Fotomicrografias de embriões nos estágios 9 a 12 H.H. C = coração; FC = flexura craniiana; M = mesencéfalo; N = neuróporo anterior; O = vesícula óptica; P = prosencéfalo; PC = pares primórdios do coração; R = rombencéfalo; S = somitos; T = telencéfalo | 36 |
| Figura 15. Fotomicrografias de embriões de <i>Gallus gallus</i> nos estágios 10 e 11 H.H. A e B - controle (PBS). C e D (25 μ g/ml), E e F (50 μ g/ml), G e H (100 μ g/ml) – tratados com Riparina III. | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabela 1. Quantidade de ovos utilizados para o experimento. | 30 |
| Tabela 2. Características presentes nos embriões de galinha de acordo com o estádio de desenvolvimento embrionário, segundo Hamburger e Hamilton (1951). | 35 |
| Tabela 3. Demonstração do grupo controle e a distribuição dos três grupos experimentais com embriões de <i>Gallus gallus</i> . | 37 |
| Tabela 4. Quantitativo dos estágios embrionários (no período de 24 horas) de incubação com o produto teste (Riparina III) e de acordo com a classificação proposta por Hamburger e Hamilton (1951). | 38 |
| Tabela 5. Média comparativa do comprimento dos pares de somitos e largura do tubo neural (μm) dos grupos controle e experimentais com embriões de <i>Gallus gallus</i> . | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS

g - grama

μ g – micrograma

mg – micrograma

mg - miligrama

mL – mililitro

mm - milímetro

kg - quilograma

μ l - microlitro

μ M – micro Mol

H.H – Hamburger; Hamilton (1951)

DTN – Defeitos do Tubo Neural

rad – Radiation Absorbed Dose

a.C. – Antes de Cristo

spp. – espécies

h - hora

v.o. – via oral

DL50 – dose letal a 50% do total de indivíduos tratados

IC50 – índice de citotoxicidade a 50% do total de indivíduos tratados

i.p. – intraperitoneal

Ca² - cálcio

AMPc - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

LTF - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

PBS - Phosphate Buffered Saline

°C – graus Celsius

G25 – Grupo Experimental com dosagem de Riparina III 25 μ g/ml

G50 – Grupo Experimental com dosagem de Riparina III 50 μ g/ml

G100 – Grupo Experimental com dosagem de Riparina III 100 μ g/ml

% - por cento

ANOVA – Análise de Variância

RIP 25 – Grupo Experimental Riparina III dose 25 μ g / ml

RIP 50 – Grupo Experimental Riparina III dose 50 μ g / ml

RIP 100 – Grupo Experimental Riparina III dose 100 μ g / ml

df – degrees of freedom

p – p-value

F – relação de duas variâncias (F-statistic)

t – t-test

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 2.1 EMBRIÕES DE AVES COMO MODELO ANIMAL | 16 |
| 2.2 DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus (domesticus)</i> | 17 |
| 2.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO <i>versus</i> AGENTES | 20 |
| TERATOGENÉTICOS | |
| 2.4 A FAMÍLIA LAURACEAE | 22 |
| 2.5 <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez | 23 |
| 2.6 ALCAMIDAS | 24 |
| 2.7 RIPARINA III (O-metil-N-2,6-dihidroxibenzoil-tiramina) | 25 |
| 2.8 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DAS ALCAMIDAS | 26 |
| NATURAIS DE <i>Aniba riparia</i> | |
| 3 OBJETIVOS | 28 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 28 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 28 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 DESENHO EXPERIMENTAL | 28 |
| 4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA | 31 |
| 5 RESULTADOS | 36 |
| 6 DISCUSSÃO | 39 |
| 7 CONCLUSÃO | 41 |
| REFERÊNCIAS | 41 |
| ANEXO | 48 |

1 INTRODUÇÃO

A família Lauraceae abrange 50 gêneros e 2.500 espécies espalhadas pelo mundo. *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) é uma planta encontrada na Amazônia, nas Guianas e a oeste dos Andes. De acordo com a sua natureza química, a *Aniba riparia* (Nees) Mez fornece uma classe especial de alcaloides contendo uma função alcamida e foram isoladas a partir do fruto verde desta planta, sendo designadas de Riparina I (éter metílico de N-benzoil-tiramina), Riparina II e Riparina III (éter metílico de N-2,6-di-hidroxi-benzoil-tiramina), sendo diferenciadas pelas suas estruturas químicas (MELO, 2012).

As riparinas I e III, quando administradas por via oral ou intraperitoneal em ratos, apresentaram efeitos ansiolíticos, mas sem quaisquer efeitos sedativos ou relaxantes musculares, eliminando assim os efeitos secundários comuns associados às benzodiazepinas clássicas (SOUSA *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2013). A riparina II é uma molécula com uma atividade anti-inflamatória interessante, possivelmente devido à sua capacidade de diminuir a produção de TNF- α e IL-1 β e o seu antagonismo da histamina (MELO *et al.*, 2013). Já a riparina III mostrou um efeito antidepressivo e aumento dos níveis de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) no hipocampo de ratos (VASCONCELOS *et al.*, 2015). A riparina A, estrutura central de todas as riparinas amazônicas e que origina todas as outras encontradas pelos alcaloides através da planta *Aniba riparia*, apresentou atividade antioxidante fraca, atividade moderada contra carcinoma de cólon, atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* (ARAÚJO *et al.*, 2016); não produziu efeito sedativo, perda de coordenação ou relaxamento muscular (NUNES *et al.*, 2015) e atenuou a resposta inflamatória pela modulação da migração de neutrófilos (MEDEIROS *et al.*, 2015).

Para se estudar os efeitos teratogênicos das riparinas, o modelo de estudo com embriões de *Gallus gallus* apresenta diversas vantagens quando são comparados com outros embriões, pois nos estágios primários de desenvolvimento estão mais suscetíveis à ação de agentes tóxicos, podendo alterar o desenvolvimento embrionário normal e interferir nos mecanismos de formação de vários sistemas orgânicos. FONSECA *et al.* (2013) forneceram uma descrição dos aspectos macro e microscópicos das estruturas ectodérmicas (sistema nervoso central, tegumentar e órgãos sensoriais) derivadas de embriões de galinha / fetos de aves de galinha capoeira (*Gallus gallus* doméstico) do

primeiro ao décimo nono dia de incubação e concluiu que esta espécie tem um padrão de desenvolvimento semelhante ao de outras espécies de aves. Os defeitos do tubo neural (DTN) são malformações congênitas do sistema nervoso central e ocorrem devido ao fechamento incompleto do tubo neural entre a terceira e a quarta semana de gestação (AU, ASHLEY-KOCH, NORTHRUP, 2010; LO, POLŠEK, SIDHU, 2014). A incidência mundial deste tipo de patologia varia de 1,0 a 10,0 por 1000 nascimentos (LO, POLŠEK, SIDHU, 2014). As crianças que sobrevivem com DTN são deixadas com incapacidades de vida (PANDEY, UPADHYAY, 2012) das mais de 300 mil que nascem todos os anos, sendo uma consequência da neurulação anormal que pode causar problemas médicos sérios, às vezes levando à morte nos períodos pré e pós-natal (UNLU, 2002; SIMSEK *et al.*, 2012).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EMBRIÕES DE AVES COMO MODELO ANIMAL.

O conjunto similar de estágios de desenvolvimento entre embriões de vertebrados possibilita a utilização de organismos modelos na embriologia experimental. Os embriões de aves são muitas vezes escolhidos como modelo experimental, pois os ovos fertilizados são fáceis de serem obtidos e observações podem ser feitas abrindo-se o ovo, com a possibilidade de acompanhamento diário em laboratório e sem que haja interferência de fatores maternos. Outros fatos que podemos destacar é que o embrião de galinha apresenta desenvolvimento relativamente curto (21 dias) perto de outros modelos mamíferos experimentais embrionários; os ovos são ricos em vitelo, fazendo com que o embrião receba seus nutrientes adequadamente; e os embriões estão localizados em uma pequena região sobre o vitelo (WOLPERT *et al.*, 2000; GILBERT, 2003), facilitando sua manipulação, observação e coleta dos mesmos.

Embriões de *Gallus gallus (domesticus)* são utilizados em experimentos para avaliação de efeitos teratogênicos de contaminantes ambientais, pois nos primeiros estágios de desenvolvimento apresentam-se muito suscetíveis à ação de agentes tóxicos, podendo assim alterar o desenvolvimento embrionário normal e interferir nos mecanismos de formação de vários sistemas orgânicos. (WOLPERT *et al.*, 2000; RIVERO *et al.*, 2006).

As incubadoras artificiais simulam o processo natural de incubação pelas galinhas, sendo que o fator essencial para êxito é o controle da temperatura que deve permanecer em torno de 37 a 38°C, pois a oscilação da temperatura influencia diretamente no desenvolvimento embrionário. Também é necessário manter umidade e ventilação controladas para que os embriões possam realizar as trocas gasosas. (WAGENINGEN *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de cada estrutura embrionária de *Gallus gallus*, foi descrito e organizado em estágios segundo Hamburguer-Hamilton (1951), pois a correlação baseada somente na idade cronológica pode levar a equívocos das reais fases morfológicas. O conhecimento detalhado de cada estágio embrionário possibilita o acompanhamento e a identificação da formação e organização das estruturas básicas dos embriões.

2.2 DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus (domesticus)*.

Os ovos de aves apresentam grande acúmulo de vitelo que permite ao embrião se desenvolver na ausência de fonte externa (materna) de alimentação. O vitelo está localizado no polo vegetativo do ovo enquanto que as estruturas citoplasmáticas e o núcleo estão completamente deslocados para o polo animal e restritos a uma pequena área (Figura 1). Devido à grande quantidade de vitelo, o sulco de clivagem desenvolve-se em um pequeno disco de citoplasma ativo no polo animal. (GILBERT, 2003).

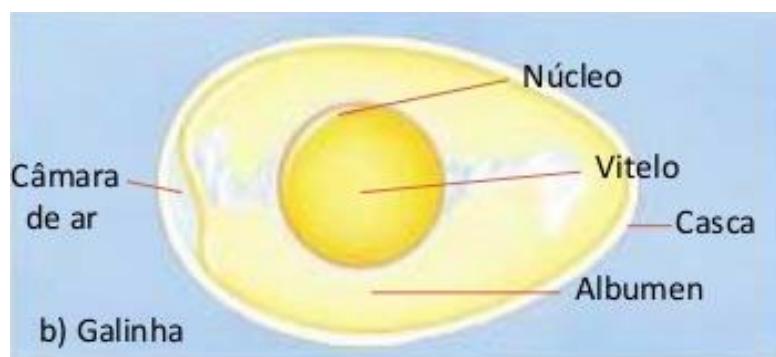


Figura 1. Constituição do ovo de galinha.

Fonte: <https://pt.slideshare.net/domenicapalomaris/tipos-de-ovos-e-clivagem-pptx-24846673>

Nas aves, o processo de clivagem inicia-se após a fertilização do óvulo no istmo do oviduto. Depois da terceira clivagem, o ovo deixa o istmo e direciona-se ao útero, onde aumenta o número de blastômeros e forma o blastodisco ou blastoderme (Figura 2). Na região central do blastoderme, as células mais profundas são descartadas para formar a zona pelúcida translúcida, enquanto as externas formam um anel periférico mais escuro, a zona opaca. No momento da postura, o blastoderma é constituído por 60.000 células,

sendo que algumas são delaminadas em cavidades subgerminais para formar a camada do epiblasto, que dará origem ao embrião e o hipoblasto, que origina as estruturas extraembrionárias. (WOLPERT *et al.*, 2000; GILBERT, 2003; GARCIA; FERNÁNDEZ, 2006).

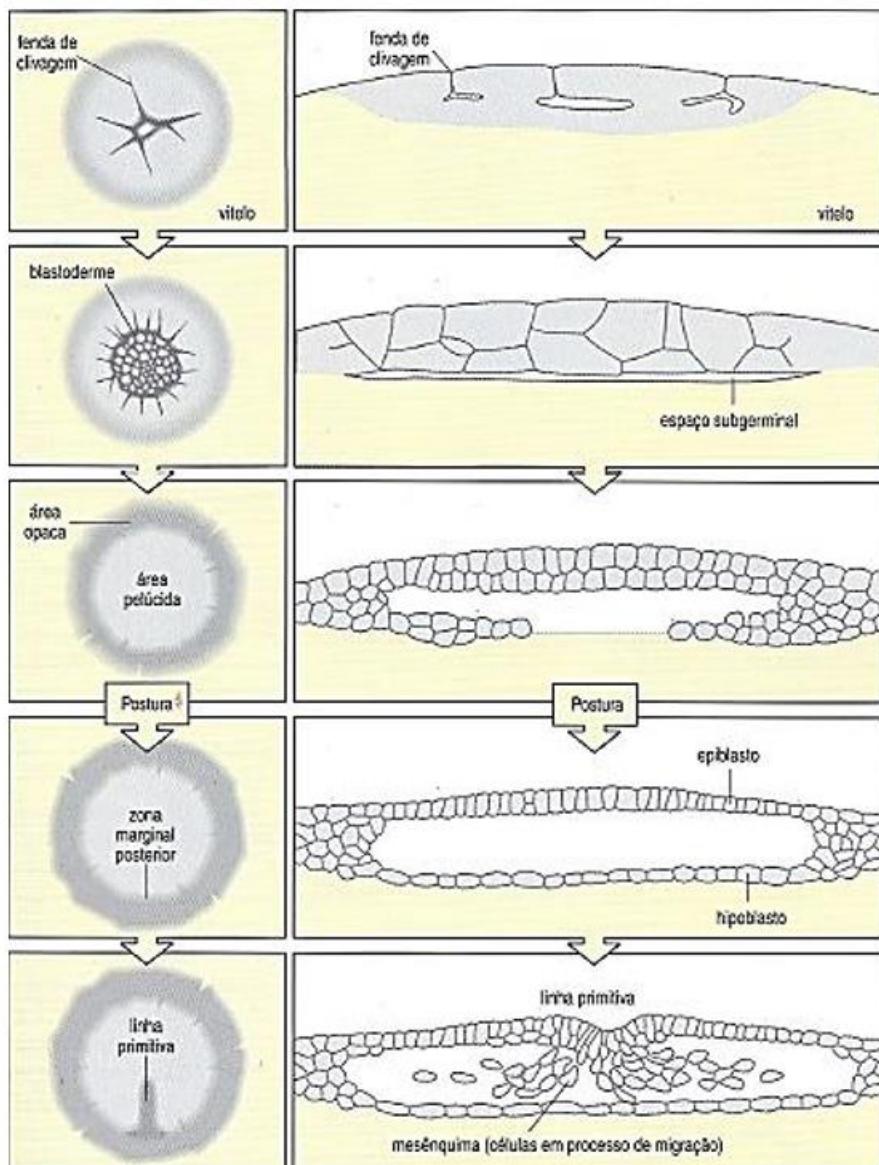


Figura 2. Clivagem e formação do epiblasto no embrião de galinha.
Fonte: WOLPERT *et al.*, 2000.

A gastrulação se inicia com o desenvolvimento da linha primitiva, que determina o eixo do embrião. Essa linha é formada pelo espessamento causado pelo ingresso de células mesodérmicas do epiblasto para dentro da blastocele, e pela migração de células da região lateral posterior em direção ao centro (Figura 2). A linha primitiva se estende em 60-75% do comprimento da área pelúcida. Os intensos movimentos celulares dão origem aos três folhetos embrionários ectoderma, mesoderma e endoderma. Na segunda

fase da gastrulação, a linha primitiva começa a regredir movendo o nódulo de Hensen de uma posição próxima do centro da área pelúcida para uma posição mais posterior. A gastrulação gera embriões com distinto grau de maturidade e desenvolvimento ântero-posterior. Enquanto uma porção de células da região posterior está gastrulando, outras na porção anterior já estão começando a formar órgãos. (WOLPERT *et al.*, 2000; GARCIA; FERNÁNDEZ 2006;).

A notocorda e os somitos são formados a medida que o nódulo de Hensen regredie. Simultaneamente, o sulco neural começa a se desenvolver como um par de pregas neurais, seguido pelo dobramento e fechamento do tubo neural, avançando em direção cefálica e caudal até que pequenas áreas permaneçam abertas em ambas as extremidades (Figura 3). Acompanhando a neurulação e o desenvolvimento da dobra cefálica, o embrião também se dobra lateralmente para formar o intestino primitivo. Os dois tubos endocárdicos juntam-se, formando um órgão localizado ventralmente e os somitos originam as vértebras, os músculos axiais dos membros e a derme. (WOLPERT *et al.*, 2000; MOORE; PERSAUD, 2008; DEBIASI, 2011).

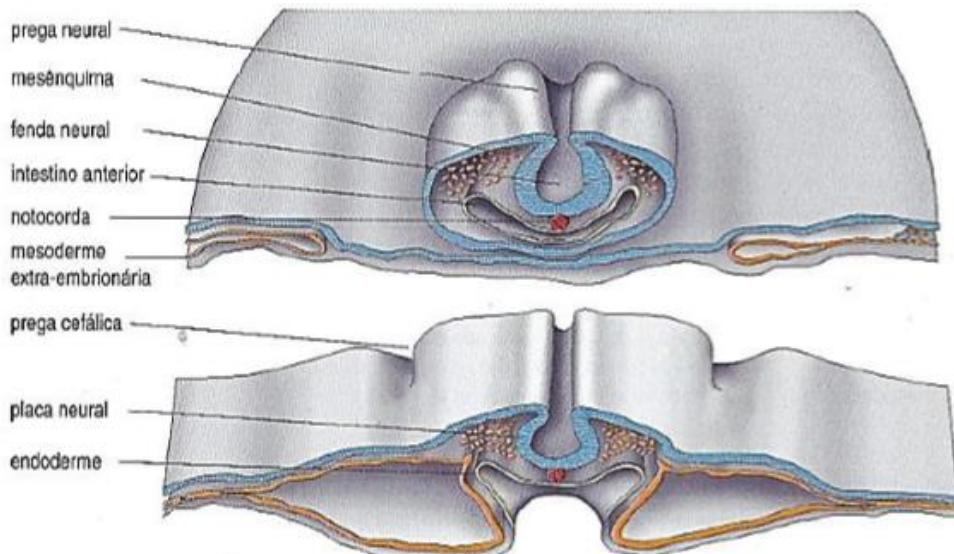


Figura 3. Desenvolvimento do Tubo Neural e Mesoderme no Embrião de Galinha.
FONTE: WOLPERT *et al.*, 2000.

Aproximadamente três dias após a postura do ovo, o embrião possui 40 somitos, cabeça bem desenvolvida, coração formado e vasos conectados com os tecidos extraembrionários, possibilitando assim a circulação com batimentos cardíacos. Nesse estágio, o embrião recebe a nutrição através das membranas extraembrionárias, proteção mecânica proveniente do saco amniótico cheio de fluido e um alantóide para o

armazenamento dos produtos oriundos da excreção. No tempo restante, antes da eclosão, se desenvolvem os olhos e os ouvidos, o embrião cresce em tamanho e os órgãos internos se desenvolvem. As asas, pernas e bico se formam e as penas surgem nas asas e no corpo. Após 21 dias de incubação o pinto eclode (Figura 4) (DEBIASI, 2011).

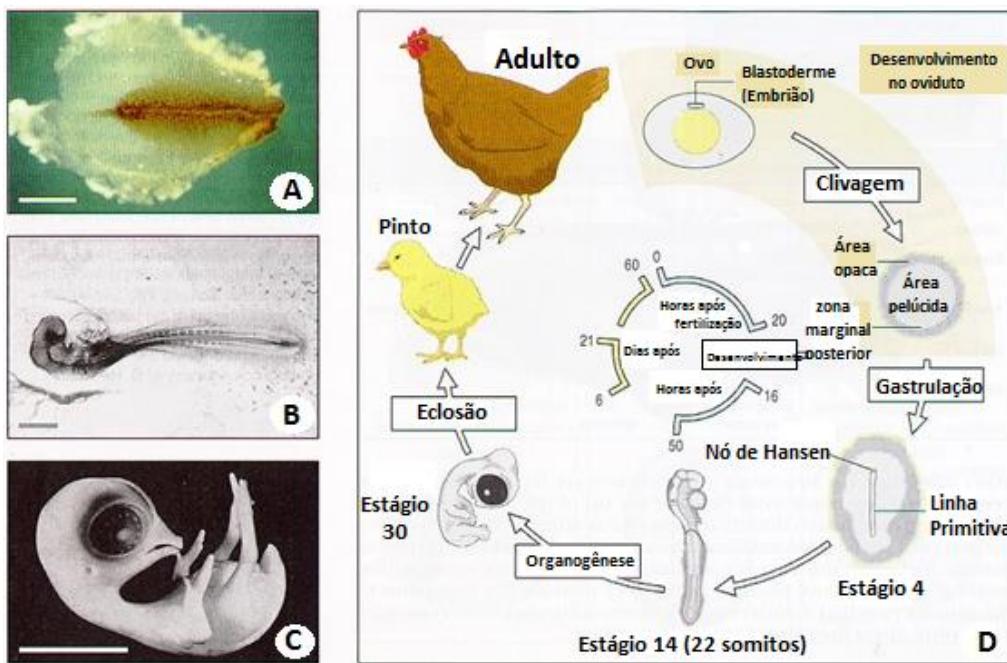


Figura 4. Desenvolvimento embrionário de uma galinha. A- Estágio 4 do desenvolvimento embrionário; B- Estágio 14 do desenvolvimento embrionário; C- Fase de organogênese (Estágio 30); D- Ciclo completo do desenvolvimento de uma galinha, desde a oviposição até a formação adulta. Estágios descritos de acordo com Hamburger-Hamilton (1951)

Fonte: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/biol3530/db_ch02/dbnmodel.html (modificado)

2.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *versus* AGENTES TERATOGÊNICOS.

Os agentes teratogênicos podem causar graves anomalias congênitas em embriões. Tais distúrbios são causados em períodos críticos do desenvolvimento, durante a diferenciação ativa de um tecido ou órgão. Os órgãos têm diferentes períodos críticos durante o seu desenvolvimento, sendo que o cérebro e o esqueleto se destacam por serem mais sensíveis, desde começo da sua formação até o nascimento. (GILBERT, 2003; GÓMEZ DUMM, 2006; MOORE; PERSAUD, 2008) (Figura 5).

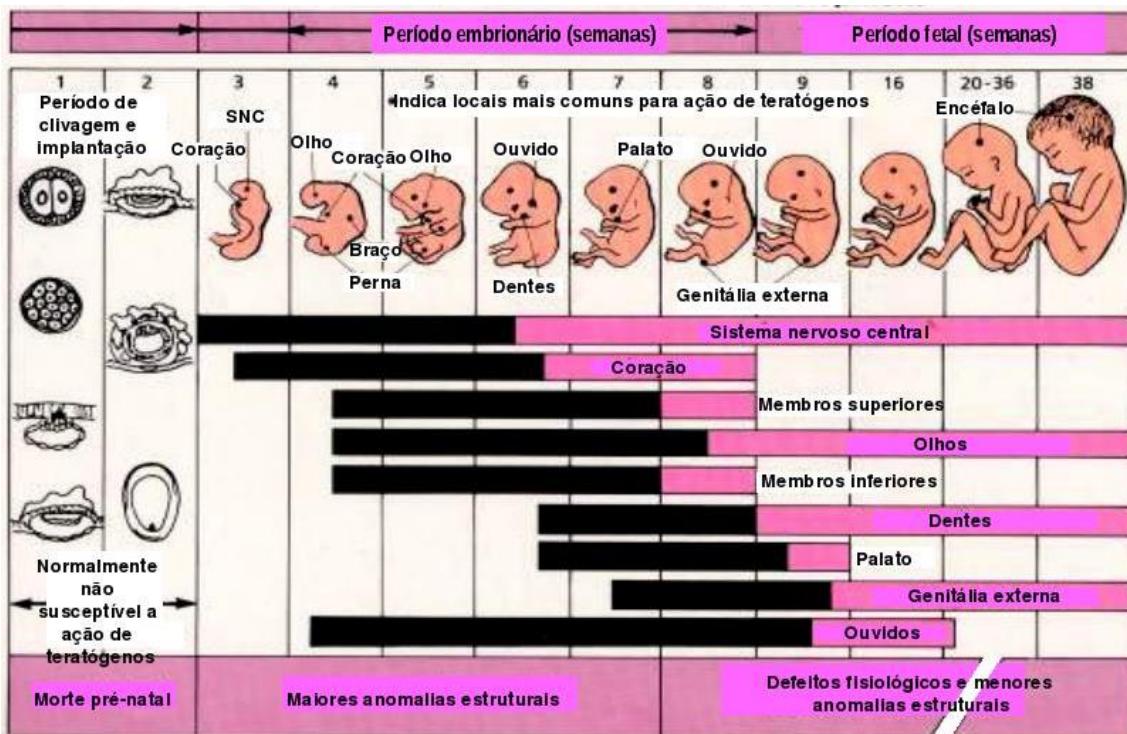


Figura 5. Semana gestacional *versus* anomalias congênitas

Fonte: <http://107.21.65.169/content/ABAAAAzvMAF/embriologia>

Segundo Rivero (2005), o acetato de chumbo é considerado como um agente teratogênico multipotente, capaz de causar alterações no desenvolvimento embrionário. Além disto, interfere nos mecanismos de morfogênese, como atraso no desenvolvimento, alterações no padrão do sistema nervoso e malformações, podendo levar à morte.

Estudos de análise morfológica em embriões de aves revelaram que o metal cádmio, também atua como um agente teratogênico, causando graves alterações na região cefálica dos embriões expostos a este metal durante o desenvolvimento (YAMAMOTO, 2009). Além disso, pesticidas e compostos orgânicos de mercúrio têm causado anormalidades (GILBERT, 2003).

Alguns compostos químicos encontrados naturalmente no ambiente também podem causar defeitos de nascimento. (GILBERT, 2003). Segundo Matos (2009), embriões de aves expostos ao extrato da planta de *Ateleia glazioviana* apresentam alterações no sistema cardiovascular, tendo como consequência a inviabilidade ou morte do embrião.

No ser humano, os maiores efeitos sobre o feto associados à radiação são retardos mentais, microcefalia e retardos de crescimento. É estimado que a incidência geral de

malformações para fetos expostos *in utero* durante os 4 primeiros meses da gestação está em torno de 0 a 1 caso por 1000 irradiados por 1 rad. O risco teórico máximo atribuído à exposição a 1 rad é de aproximadamente 0,003%, sendo, portanto, muitas vezes menor que o risco de abortamento, malformações espontâneas ou doenças genéticas. Por esta razão, não há nenhum dado que sugira que haja aumento do risco para o feto de aborto, retardo do crescimento ou malformações congênitas com doses menores que 5 rads (dose absorvida de radiação), o que é o caso das exposições a raio-X para fins diagnósticos (BRENT, 1986; WILLIAMS-FLETCHER, 2010).

A capacidade de um agente produzir defeitos congênitos depende do genótipo do conceito, estágio do desenvolvimento por ocasião da exposição, da dose e da duração da exposição. O mecanismo de ação dos teratógenos pode envolver a inibição de um processo bioquímico ou molecular específico, a patogênese pode envolver morte celular, diminuição da proliferação celular ou outros fenômenos celulares. (SADLER, 2005).

2.4 A FAMÍLIA LAURACEAE

As primeiras evidências do uso de plantas com fins terapêuticos datam de 460 a.C (CONSERVA, 1985). No entanto, as primeiras informações sobre o uso sistemático de plantas como medicamentos datam da Índia Antiga (OLIVEIRA, 1986; CARVALHO *et al.*, 2002). A busca de novos compostos vegetais com ação antimicrobiana se apresenta como um modelo experimental, ecologicamente correto, para se produzir substâncias que sejam eficazes e menos agressivas ao meio ambiente e aos homens, contribuindo, assim, com a melhoria da qualidade de vida (MELO, 2012).

O Brasil possui uma grande biodiversidade de plantas, sendo detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, o que implica numa considerável quantidade de produtos naturais a serem pesquisados, despertando interesse nas mais variadas áreas de investigação como biológica, química, farmacêutica, médica e biomédicas, econômica, entre tantas outras (FIRMO *et al.*, 2014).

As plantas da família Lauraceae têm distribuição pantropical, sendo bem representadas na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar, e pouco expressivas no sul da África, possuindo 2.500 espécies subordinadas a 50 gêneros (ROHWER, 1986; ARAÚJO *et al.*, 2016). No Brasil, ocorrem 19 gêneros e cerca de 390 espécies que habitam, em sua maior parte, as florestas pluviais e também as restingas e os cerrados (BARROSO, 1978, VICENTINI *et al.*, 1999). São árvores e arbustos encontrados nas florestas tropicais e subtropicais com casca, folhas verdes e frutos.

Os principais gêneros incluem *Cinnamomum* (250 spp.), *Ocotea* (300-400 spp.), *Persea* (150 spp.), *Litsea* (400 spp.), *Cryptocarya* (200-250 spp.), *Aniba* (40 spp.), *Neolitsea* (80 spp.), *Lindera* (100 spp.), *Laurus* (2 spp.) (EVANS, 1996). Algumas espécies têm sido utilizadas pelas indústrias para a fabricação de diversos produtos, porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, 2001).

As Lauraceae destacam-se entre as demais famílias pela sua importância econômica que é conhecida desde os tempos remotos, através de documentos da China de 2800 a.C., onde já era empregado o óleo de *Cinnamomum camphora* e de outras espécies do gênero na medicina (MELO *et al.*, 2013). As folhas de *Laurus nobilis*, o loureiro, eram utilizadas pelos antigos gregos e romanos para confeccionar coroas, com as quais se homenageavam guerreiros e atletas vitoriosos, e estão entre os condimentos conhecidos da culinária de todo o mundo. O produto alimentício mais comercializado em quase toda a América é o fruto de *Persea americana*, o abacateiro, do qual também se extraí, do mesocarpo e da semente, o óleo para a fabricação de cosméticos (BARBOSA-FILHO, 1990).

Atualmente, o potencial econômico das espécies dessa família é usado na indústria de perfumaria e na indústria química (*A. roseadora*, *A. carnellita*, *A. parviflora*), em marcenaria (*O. organensis*, *Aniba firmula*, *A. terminalis*) e construção civil (*Ocotea acutifolia*, *O. aciphylla*, *O. catharinensis*), na culinária (*Persea americana*, *P. gratissima*, *Laurus nobilis*), na fabricação de papel (*Ocotea puberula*, *O. elegans*), e, ainda, na medicina popular (*Ocotea aciphylla*, *O. spectabilis*, *O. pulchella*, *O. teleandra*, *Laurus nobilis* e *Aniba riparia*) (MARQUES, 2001; JOSHI *et al.*, 2010). Essa importância econômica que as Lauraceae apresentam e a inexistência de programas efetivos de manejo florestal são alguns dos fatores que colocam sob perigo de extinção da maior parte de suas espécies (ARAÚJO, 1994; VEIGA-JUNIOR, 2008).

2.5 *ANIBA riparia* (Nees) Mez

Podemos encontrar a *Aniba* como um gênero que compreende cerca de 40 espécies de arbustos e árvores de planície, com o centro da sua diversidade na Amazônia e nas Guianas, podendo estender-se para os Andes, as montanhas do norte da Venezuela e leste e sul do Brasil (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

Uma de suas espécies, a *Aniba riparia* (Nees) Mez é conhecida popularmente como “louro”, “louro-faia” ou “pau-rosa” (MARQUES, 2001). Essa planta apresenta

algumas características peculiares, tais como, folhas cartáceas, foscas em ambas as faces, reticulação aureolada, ramos de 3 mm de espessura, marrons e lenticelados, pecíolo canaliculado, engrossado na base e gema terminal menor que 4 mm (VICENTINI *et al.*, 1999) (Figura 6).

Segundo Barbosa-Filho (1997), a quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora brasileira são imensuráveis e permite o estudo de plantas nativas de cada região bem como o estudo de plantas exóticas na Paraíba como é o caso da *Aniba riparia* (Nees) Mez, (Lauraceae), árvore típica da região amazônica. Pode-se obter um extrato dos frutos e dos cálices persistentes desta planta que possuem atividade antibiótica comprovada contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiela pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (MARQUES, 2001).



Figura 6. *Aniba riparia* (Nees) Mez

Fonte: <http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/?page=view&id=26963>

2.6 ALCAMIDAS

As alcamidas naturais constituem uma classe especial de alcalóides contendo uma função amida restrita a poucos representantes na natureza (CATÃO *et al.*, 2005). Do ponto de vista biogênico, as alcamidas representam uma classe distinta de produtos naturais que se forma ao serem conjugadas nas diferentes rotas metabólicas, sendo, portanto, metabólitos secundários, cuja estrutura geral se origina da condensação de um

ácido graxo insaturado e uma amina, formando assim, uma amida (alcamida) (HOFER *et al.*, 1986).

O grupo funcional amida é ubíquo; encontra-se em todos os organismos vivos constituindo as uniões peptídicas, isto é, uma união entre os aminoácidos para a formação da estrutura primária de uma proteína, base funcional da vida. As amidas como produtos naturais, por outro lado, não são tão abundantes. No entanto, as alcamidas são consideradas compostos bioativos, isto é, uma pequena quantidade desses compostos apresenta uma resposta notável nas células receptoras (TORRES & CHAVEZ, 2001).

As alcamidas podem ser formadas a partir de feniletilaminas naturais, como a tiramina e a dopamina, com ácidos orgânicos. A tiramina tem sido frequentemente encontrada em conjugados formando alcamidas em algumas plantas, como por exemplo, na forma de N-trans-coumaroil-tiramina na espécie *Piper sanctum* (MATA *et al.*, 2004), na forma de N-feruropoil-tiramina na *Piper argyrophyllum* (SINGH *et al.*, 1996) e na forma de N-benzoil-tiramina na *Aniba riparia* (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987), além de seus análogos.

Do ponto de vista fitoquímico, a *Aniba riparia* (Nees) Mez, fornece uma classe especial de alcaloides contendo uma função alcamida, restrito a poucos representantes na natureza (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987; CASTELO-BRANCO, 1992). Após a elucidação estrutural de um dos seus compostos o *O*-metil-*N*-(2-hidroxibenzoil) tiramina verificou-se que, biogeneticamente, esta molécula era resultado da condensação de duas substâncias: o éter metílico da tiramina (agente simpaticomimético) e o ácido salicílico (agente queratolítico e antimicótico); despertando a partir daí, o interesse para se verificar a potencialidade farmacológica deste produto natural, de modo que este e outros análogos foram sintetizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1990), das quais, três são de ocorrência natural e foram isoladas pela primeira vez da *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae), sendo chamadas de riparininas (I, II e III), denominação esta em referência à planta, onde a riparina III representou 34% de todos os componentes extraídos (BARBOSA-FILHO *et al.* 1987).

2.7 RIPARINA III (*O*-metil-*N*-2,6-dihidroxibenzoil-tiramina)

Isolada do fruto verde de *Aniba riparia*, a riparina III é um alcalóide do ciclo não heterocíclico, mais especificamente, uma alcamida natural, caracterizada como uma

feniletilamida de ácido benzóico, é o componente majoritário isolado do fruto não maduro. É formada da união da tiramina, uma feniletilamina, e o ácido benzóico. Apresenta duas substituições no anel do ácido benzóico, acrescentando duas hidroxilas. Além disso, o anel da tiramina apresenta um metil ligado ao oxigênio formando uma função éter (Figura 7).

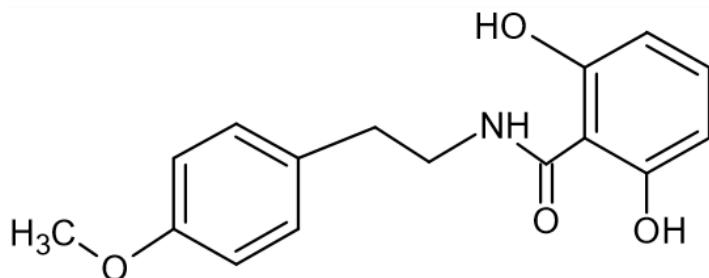


Figura 7. Estrutura química da Riparina III

Fonte:http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/19475/1/2015_art_asvasconcelos.pdf
(modificado)

2.8 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DAS ALCAMIDAS NATURAIS DE *Aniba riparia*

O uso tradicional desta planta não é registrado na literatura, no entanto, estudos farmacológicos com os constituintes maiores isolados, as riparinas I, II e III, mostram alguns efeitos biológicos (ARAÚJO, 2016).

Alguns pesquisadores tiveram o interesse em verificar a potencialidade farmacológica das amidas naturais isoladas do fruto verde de *Aniba riparia*, riparina I e III, além de uma análoga sintetizada, riparina XIII, sobre cepas de microorganismos multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As amidas mostraram-se eficazes frente às cepas de ambos microorganismos, no entanto, o maior percentual de atividade foi contra as cepas de *S. aureus*. Além disso, foram testadas drogas usadas rotineiramente na clínica médica como, por exemplo, penicilina, ampicilina e lincomicina contra *S. aureus* e, tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol-trimetropina e cloranfenicol contra *E. coli* e, observou-se que a sensibilidade destas cepas frente a esses antimicrobianos foi menor que a das riparinas, mesmo tratando-se de cepas multirresistentes (CATÃO *et al.*, 2005).

Em ações farmacológicas estudadas, foi demonstrado que a riparina III apresentou potente atividade relaxante no músculo liso. Em concentrações de 8 a 30 μ M essa amida antagonizou as contrações induzidas por acetilcolina e histamina em fíleo de

cobaia, além de inibir as contrações induzidas por ocitocina e bradicinina em útero de ratas virgens. Além disso, em traquéia de cobaia, inibiu o tônus espontâneo (IC50 7,7 μ M) e as contrações induzidas por carbachol (IC50 10 μ M) (CASTELO-BRANCO *et al.*, 1991; CASTELO-BRANCO, 1992).

O efeito espasmolítico da riparina III foi investigado levando em consideração o envolvimento do composto com o metabolismo do Ca^{2+} . Foi demonstrado que a riparina III é capaz de induzir um efeito espasmolítico, principalmente, devido à inibição de influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular e da inibição da liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} , não envolvendo a participação da geração de AMPc (THOMAS *et al.*, 1994).

Além disso, as riparinas I, II e III apresentam efeito hipotensor e bradicárdico transitório, devido a uma ação que parece envolver, principalmente, um componente de origem parassimpática a nível cardíaco (SEIXAS, 1996).

Alguns estudos foram feitos com relação a toxicidade aguda das amidas de *Aniba riparia* e os resultados obtidos mostraram que as três substâncias (riparina I, II e III) quando administradas por via oral (v.o.) em doses de até 1 g/kg não causaram mortes de camundongos em até 48h. A toxicidade, por via intraperitoneal (i.p.), em doses semelhantes de riparina I e II também não foram letais. Contudo, a riparina III causou mortes de forma dose dependente e o valor da DL50 obtida graficamente a partir do gráfico de probitos log dose foi de 104,2 mg/kg. Além disso, foram realizados testes hipocráticos para verificar se essas amidas, nas doses de 500 mg/kg, v.o. e i.p., para riparina I e II, e 500 mg/kg v.o. e 35 mg/kg i.p. para riparina III, provocariam alterações centrais, autonômicas ou musculares. Os resultados obtidos mostraram que as três amidas não causaram mudanças significantes nas funções descritas acima nas doses analisadas (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

Além desses efeitos investigados por diversos pesquisadores, estudos realizados no laboratório de Neurofarmacologia da Universidade Federal do Ceará mostraram que as três riparinas apresentam efeitos sobre o sistema nervoso central, como antidepressivo e ansiolítico, além de efeitos analgésicos, dados que foram publicados em diversos trabalhos. As investigações sobre o SNC mostraram que as três substâncias apresentam efeitos ansiolíticos em modelos animais de labirinto em cruz elevado e placa perfurada, com o possível envolvimento do sistema gabaérgico (SOUSA *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2006). A riparina III também apresentou efeito anticonvulsivante em modelo de convulsão (VASCONCELOS *et al.*, 2015) induzido por

pentilenotetrazol e efeito antidepressivo em modelos animais de nado forçado e suspensão da cauda, em testes de *screening* de ações centrais, que geraram uma dissertação de mestrado e dois trabalhos publicados (SOUZA *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2006). Mais recentemente, a riparina I apresentou efeito analgésico no teste de contorções abdominais e formalina (ARAÚJO *et al.*, 2009), e a riparina II, também apresentou efeito antidepressivo, com a participação dos sistemas monoaminérgicos em seu efeito (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL.

Estudar o efeito da riparina III sobre a morfogênese do sistema nervoso central em embrião de *Gallus gallus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Proceder a incubação dos ovos de *Gallus gallus* fertilizados e injetados com a riparina III nas concentrações 25, 50 e 100 µg/mL com 24 horas de incubação;
- Avaliar as características anátomo-morfológicas do embrião de *Gallus gallus* sobre o efeito da riparina III nas concentrações 25, 50 e 100 µg/mL, através da montagem total;
- Realizar análise histométrica das estruturas do sistema nervoso (tubo neural e somitos) de embrião de *Gallus gallus* sobre o efeito da riparina III nas concentrações 25, 50 e 100 µg/mL, através de preparações embriológicas coradas com Hematoxilina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

- Comitê de Ética

Esta pesquisa teve a aprovação do Comitê de Ética para trabalhar com animais experimentais (Nº 23076.022496 / 2015-89).

- Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

- Amostra teste

Foram utilizados produtos sintéticos originados da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), a Riparina III pertencente a classe química Benzoil-tiramina, procedente do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF - UFPB). O composto testado foi cedido pelo Professor Dr. José Maria Barbosa Filho do LTF- UFPB.

- Aquisição e higienização dos ovos

Os ovos foram adquiridos da G3 Agroavícola, localizada na cidade de Pombos no Estado de Pernambuco, com um dia de fertilizados. Antes dos experimentos foram higienizados com papel toalha, levemente umedecida com etanol 70% colocados na chocadeira por 24 horas para disparar o desenvolvimento. Apenas ovos com aproximadamente 70g foram numerados com lápis preto na própria casca para identificá-los com relação aos grupos experimentais.

- Grupo experimental

Nesse estudo foram manipulados um total de 80 ovos fertilizados. De acordo com Berger (1971 apud SCHATZ, 2003), as espécies utilizadas neste estudo apresentam a seguinte classificação taxonômica: Classe Aves; Subclasse Neornithes; Super Ordem Neognathae; Ordem Galliformes; Família Phasianidae. Dos 80 ovos fertilizados, apenas 70 apresentaram embriões de galinha *Gallus gallus* e foram incubados em uma chocadeira automática (Marca: NELIPE) umidificada à 37,5°C por 24 horas, com umidade atmosférica mantida através de um recipiente com 2000 mL de água, que foi trocada a cada dois dias. Diariamente, a chocadeira foi aberta por três minutos para renovação do ar. O disco embrionário foi identificado pela técnica de ovoscopia. As soluções foram injetadas no ovo através da câmara de ar em um volume de 10 μ L. Os ovos, então, foram incubados por mais 24 horas e separados em dois grupos (Tabela 1): (1) grupo controle, os quais foram injetados com solução salina tamponada (PBS, pH 7,0); (2) grupo teste, nos quais foram injetadas as soluções de Riparina III em diferentes concentrações (25, 50 e 100 μ g/mL) (Figura 8).



Figura 8. Ovos selecionados para grupo controle (PBS) e grupo experimental nas concentrações 25, 50 e 100 µg/ml de Riparina III

Fonte: Lima, 2017

Tabela 1. Quantidade de ovos utilizados para o experimento

| Grupo: | Quantidade ovos |
|--------------------------|-----------------|
| PBS - Controle | 20 |
| 25µg/ml de Riparina III | 16 |
| 50µg/ml de Riparina III | 17 |
| 100µg/ml de Riparina III | 17 |
| Total | 70 |

Fonte: Lima, 2017

Para administração da dose foi usada uma agulha com diâmetro externo de 0,70 mm (tamanho: 25x7), para perfurar a casca do ovo e dessa forma facilitar, posteriormente, a entrada da agulha de insulina que foi utilizada para injetar as soluções. Após a injeção das soluções, os orifícios feitos nos ovos foram selados com fita adesiva e estes voltaram a ser incubados na chocadeira.

- Processamento dos ovos incubados

Após a última incubação de 24 horas (Figura 9), os ovos foram quebrados com o auxílio de tesoura e pinça de ponta fina, o disco embrionário recortado e transferido com

o auxílio de um pincel para uma placa de Petri, contendo PBS para remoção do excesso de vitelo.



Figura 9. Foto da chocadeira automática (Marca: NELIPE) para a incubação dos ovos

Fonte: Lima, 2017

4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

- Procedimento Histológico: Montagem Total

Os embriões com 24 horas de incubação foram processados com a técnica de montagem total. Os ovos, inicialmente, foram abertos (Figura 10) e seus discos embrionários recortados com auxílio de tesoura e pinça. Posteriormente, os embriões dos grupos controle e experimentais foram colocados em placas de Petri contendo PBS e, lavados para remoção do excesso de vitelo (Figura 11). Em seguida, foi colocado, sobre o disco embrionário, um papel filtro retangular com um recorte em forma de losango na região central para encaixar sobre o embrião, com o intuito de mantê-lo distendido e posteriormente ser submerso na solução fixadora (BOUIN) por 24 horas a temperatura ambiente, em uma placa de Petri fechada.

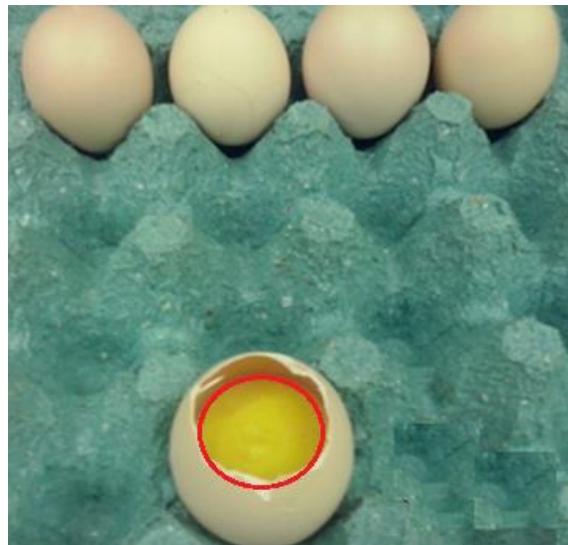


Figura 10. Ovo aberto indicando local do disco embrionário área circundada em vermelho.

Fonte: Lima, 2017

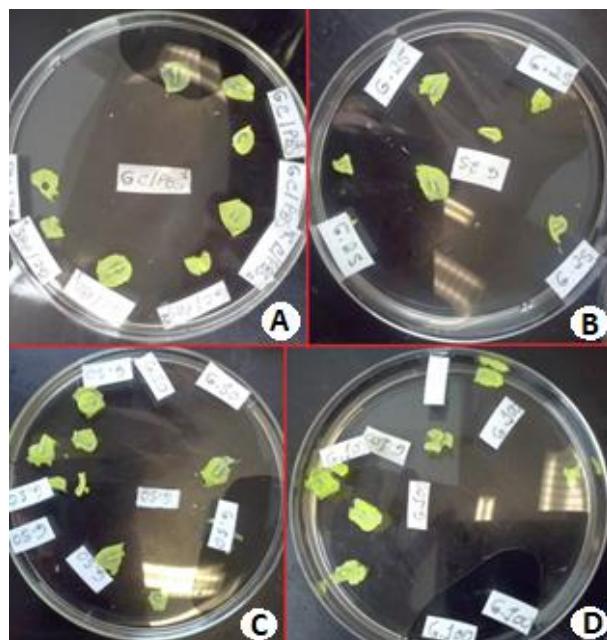


Figura 11. Embriões lavados com PBS em placas de petri para remoção do excesso de vitelo. A - grupo controle; B - dose de 25 μ g/ml de Riparina III; C - dose de 50 μ g/ml de Riparina III; D - dose de 100 μ g/ml de Riparina III.

Fonte: Lima, 2017.

Após a fixação, os embriões foram lavados em água destilada e colocados em etanol 70%, onde permaneceram por 12 horas. Posteriormente, os embriões foram hidratados em água destilada por 10 minutos (2 banhos de 5 minutos cada) e submersos no corante Hematoxilina-eosina por 30 segundos e lavados com água destilada.

Após a etapa de coloração, os embriões foram desidratados em uma série alcoólica crescente (etanol a 70, 80, 90% e 100% por 10 minutos cada) e, em seguida, foram diafanizados em dois banhos consecutivos de xilol, por 10 minutos cada (Figura 12).

Para a montagem das lâminas permanentes foi utilizado Entellan®. Após a confecção das preparações embriológicas permanentes, a análise foi realizada em um sistema de microscopia óptica (Microscópio LABOMED LX 400, com câmera digital MOTICAM 1000 1.3M Pixel–USB 2.0, QUIMIS) para captura e registro das imagens, utilizando o *Software MOTIC Image Plus 2.0*.

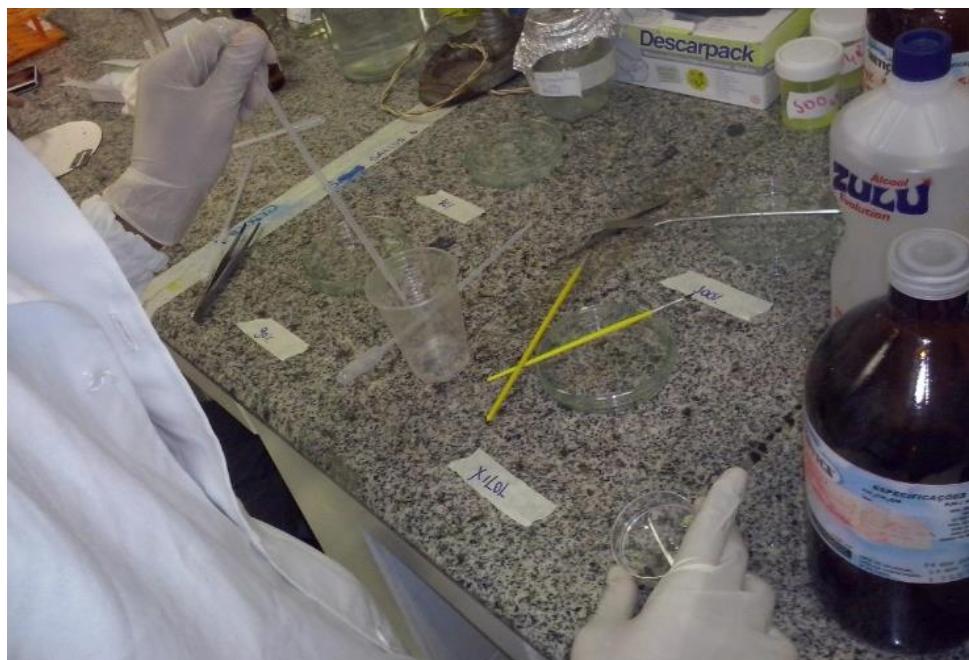


Figura 12. Desidratação em série alcoólica e diafanização em xilol dos embriões

Fonte: Lima, 2017

-Procedimento Histológico para Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi realizada segundo a avaliação referente ao desenvolvimento do Tubo Neural (estruturas precursoras do Sistema Nervoso Central), com mensuração da largura do tubo neural e comprimentos dos somitos, utilizando o *Software ImageJ* (Figura 13).

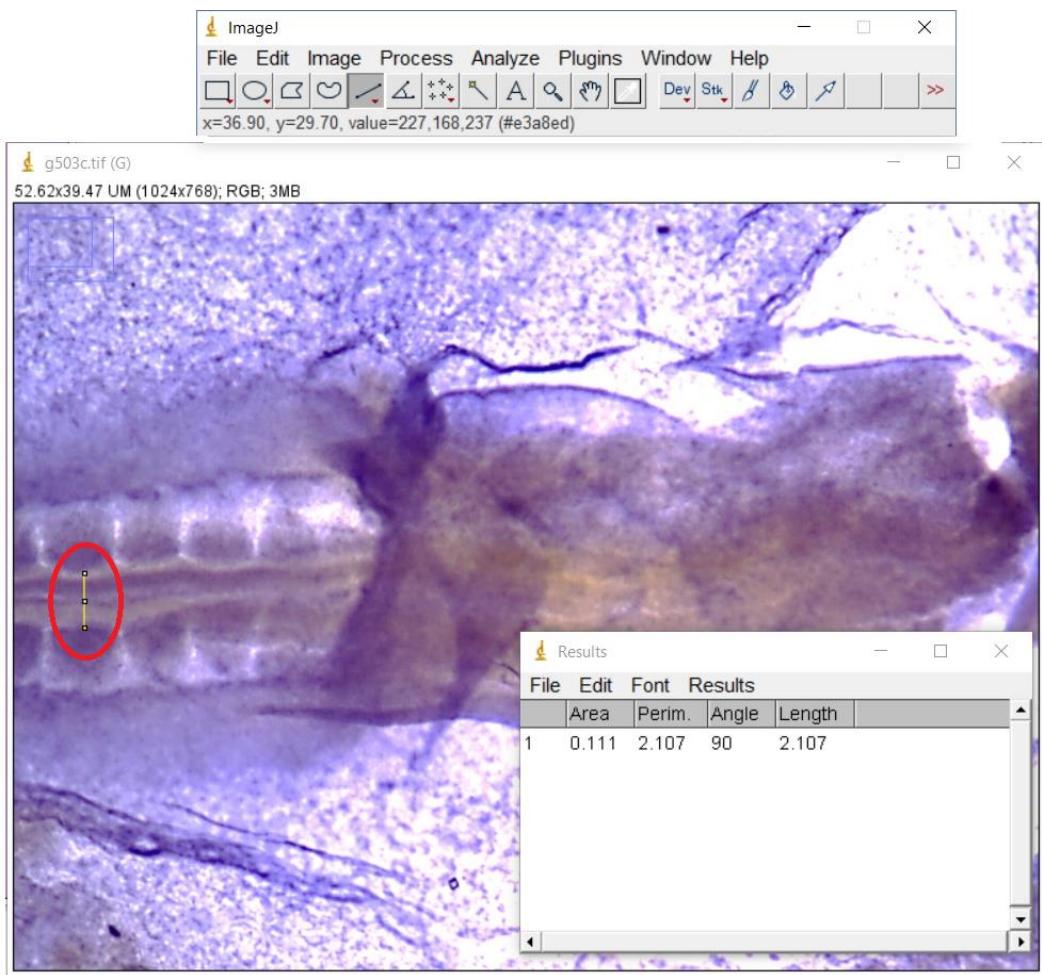


Figura 13. Exemplo de mensuração da largura do tubo neural (μm): círculo vermelho. Embrião no estágio 10 H.H do grupo experimental de RIP50. Area = área; Perim. = perímetro; Angle= ângulo; Length = comprimento

Fonte: Lima, 2017

- Determinação do estágio embrionário

O estágio de desenvolvimento embrionário foi determinado de acordo com o número de somitos seguindo as características descritas (Tabela 2) por Hamburger-Hamilton (1951). Outras características, além do número de somitos, podem ser observadas em cada estágio, segundo H.H (Figura 14).

Tabela 2. Características presentes nos embriões de galinha de acordo com o estádio de desenvolvimento embrionário, segundo Hamburger e Hamilton (1951).

| Estágio embrionário | Características |
|----------------------------|--|
| 9 | <p>Sete somitos.</p> <p>29 a 33 horas.</p> <p>Vesículas ópticas primárias estão presentes.</p> <p>Os pares primórdios do coração começam a se fundir.</p> |
| 10 | <p>Dez somitos.</p> <p>33 a 38 horas.</p> <p>O primeiro somito está se dispersando e não está incluído nas contagens das fases subsequentes.</p> <p>Primeira indicação da flexura craniana.</p> <p>Três vesículas cerebrais primárias são claramente visíveis.</p> <p>Vesícula óptica não se contraiu em bases.</p> <p>Coração inclina-se ligeiramente para a direita.</p> |
| 11 | <p>Treze somitos.</p> <p>40 a 45 horas.</p> <p>Leve curvatura craniana.</p> <p>Cinco neurómeros da parte posterior cerebral são distintos.</p> <p>O neuróporo anterior está se fechando. ,</p> <p>As vesículas ópticas estão constringidas nas bases.</p> <p>Coração inclinado para a direita.</p> |
| 12 | <p>Dezesseis somitos.</p> <p>45 a 49 horas.</p> <p>A cabeça está inclinada para o lado esquerdo.</p> <p>Neuróporo anterior fechado.</p> <p>Telencéfalo presente.</p> <p>Vesículas ópticas primárias e haste ótica bem estabelecidas.</p> <p>O conduto auditivo é extenso e profundo, mas aberto.</p> <p>Coração está ligeiramente em forma de “S”.</p> |

Fonte: Hamburger-Hamilton (1951) (adaptado).

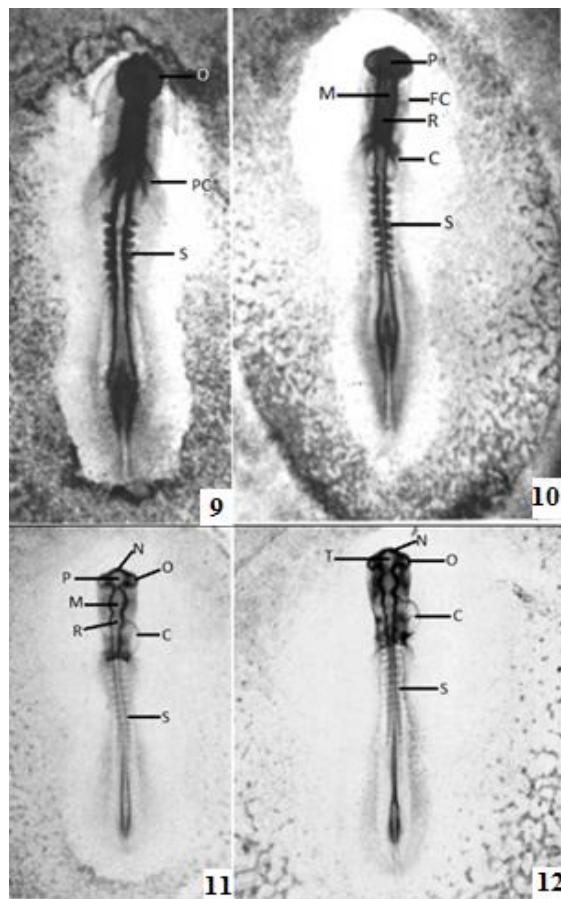


Figura 14. Fotomicrografias de embriões nos estágios 9 a 12 H.H. C = coração; FC = flexura craniana; M = mesencéfalo; N = neuróporo anterior; O = vesícula óptica; P = prosencéfalo; PC = pares primórdios do coração; R = rombencéfalo; S = somitos; T = telencéfalo

Fonte: Hamburger-Hamilton (1951).

- Análise estatística

A análise de dados foi realizada com o teste One Way (ANOVA). Valores de probabilidade $p \leq 0,05$ foram considerados para indicar diferença significativa. O software SigmaStat 3.5 foi utilizado para análise.

5 RESULTADOS

Durante o procedimento de montagem total dos embriões, foi estabelecido que cada embrião deveria ter, pelo menos, quatro pares de somitos, dobras neurais do futuro mesencéfalo e uma porção do cérebro posterior, o que significa estabelecer os critérios de um ovo saudável e desenvolvimento biológico normal, além de maior visualização de

estruturas. Após 24 horas de incubação pós-injeção dos grupos pesquisados, 32,85% (n=23) dos embriões apresentaram desenvolvimento insuficiente (estágio inferior a 8), enquanto outros 7,14% (n=05) foram perdidos pelo procedimento histológico devido ao rompimento das membranas extraembrionárias no momento de recortar o disco embrionário (Tabela 3).

Os estágios do desenvolvimento embrionário estudados foram classificados entre 9 e 12, com a maioria obtida entre 10 e 11 (Figura 15). Em todos os grupos (n=42), identificamos 9,52% de embriões no estágio 9, 52,38% de embriões no estágio 10, 35,71% de embriões no estágio 11 e 2,39% de embriões no estágio 12 (Tabela 4).

Tabela 3. Demonstração do grupo controle e a distribuição dos três grupos experimentais com embriões de *Gallus gallus*.

| | Grupo | Grupos Experimentais (Riparina III- μ g/ml) | | |
|--------------------------------------|-------|---|----|-----|
| | | Controle | | |
| | | 25 | 50 | 100 |
| Número de ovos | 20 | 16 | 17 | 17 |
| Desenvolvimento Normal | 12 | 10 | 10 | 10 |
| Desenvolvimento Insuficiente | 6 | 6 | 6 | 5 |
| Perdido por procedimento histológico | 2 | - | 1 | 2 |

FONTE: LIMA, 2017

Na tabela 3, todos os grupos tiveram uma quantidade de embriões em bom desenvolvimento estudados. O grupo controle e o grupo experimental de Riparina III 100 μ g/ml perderam dois embriões cada por procedimento histológico incorreto, enquanto que no grupo experimental de Riparina III 50 μ g/ml perdeu-se apenas um embrião. Desenvolvimento insuficiente significa estágio embrionário menor que 8, de acordo Hamburger-Hamilton (1951).

Tabela 4. Quantitativo dos estágios embrionários (no período de 24 horas) de incubação com o produto teste (Riparina III) e de acordo com a classificação proposta por Hamburger e Hamilton (1951).

| Grupos | Lâminas | | | |
|---|-----------|------------|------------|------------|
| | Estágio 9 | Estágio 10 | Estágio 11 | Estágio 12 |
| Controle (PBS) | 1 | 5 | 6 | --- |
| Experimental Riparina III dose 25 µg/ml | --- | 6 | 3 | 1 |
| Experimental Riparina III dose 50µg/ml | 2 | 4 | 4 | --- |
| Experimental Riparina III dose 100µg/ml | 1 | 7 | 2 | --- |

FONTE: LIMA, 2017

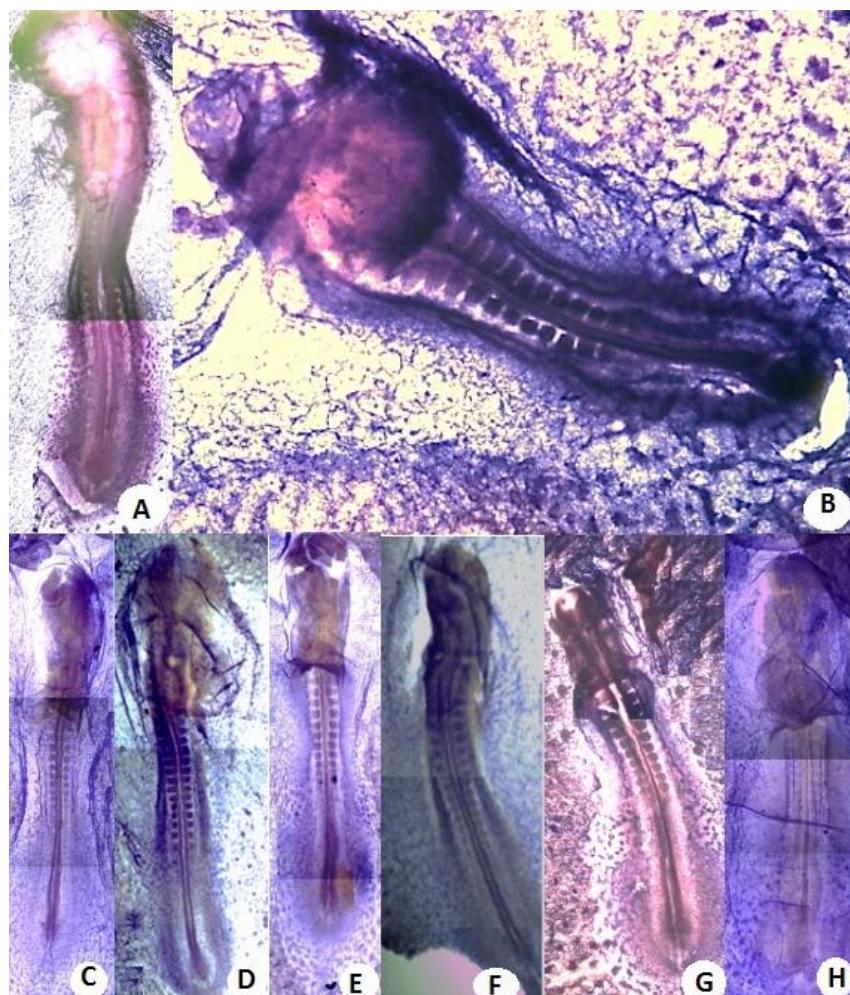


Figura 15. Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus* nos estágios 10 e 11 H.H. A e B - controle (PBS). C e D (25 µg/ml), E e F (50 µg/ml), G e H (100 µg/ml) – tratados com Riparina III. Nota-se presença de somitos sem alterações. Aumento: 4x (Hematoxilina).

Fonte: Lima, 2017

Quando os embriões de *Gallus gallus* foram examinados quanto à condição morfométrica, observamos diferenças entre os grupos experimentais com relação ao comprimentos de somitos e largura do tubo neural. No grupo com Riparina III na dose 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (RIP 25), os comprimentos dos somitos mostraram-se muito próximos ao grupo de controle (PBS), exceto para a largura do tubo neural. Os somitos aumentaram de comprimento significativamente com as dosagens de Riparina III de 50 (RIP 50) e 100 (RIP 100) $\mu\text{g} / \text{ml}$ ($df = 3,41$, $p \leq 0,001$, $F = 37,14$, $t = 7,919$). Em relação à largura do tubo neural, os resultados mostraram-se significativos em todos os grupos tratados quando comparados com o controle ($df = 3,41$, $p \leq 0,001$, $F = 12,478$, $t = 2,184$ com RIP 25, $t = 2,822$ com RIP 50 e $t = 3,401$ com RIP 100) (Tabela 5).

Tabela 5. Média comparativa do comprimento dos pares de somitos e largura do tubo neural (μm) dos grupos controle e experimentais com embriões de *Gallus gallus*. Teste estatístico ANOVA ($p \leq 0,05$).

| | Grupo | Grupos Experimentais (Riparina III- $\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | |
|----------------------------------|-------|---|-------|------|-----|
| | | Controle | Doses | | |
| | | | 25 | 50 | 100 |
| Comprimento dos pares de somitos | 1,50 | 1,54 | 1,92 | 1,92 | |
| Largura do tubo neural | 1,55 | 1,10 | 2,10 | 1,90 | |

FONTE: LIMA, 2017

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez que a administração da Riparina III foi capaz de alterar os somitos e tubo neural dos embriões de galinha. Foi medido a largura do tubo neural em todos os embriões no estudo a partir do quarto par de somitos em direção caudal; não sendo detectadas alterações morfológicas nos embriões quando comparado ao grupo controle.

O período entre o surgimento da placa neural e o fechamento do palato, ou seja, entre o décimo oitavo ao sexagésimo dia de gestação, representa a fase com maior probabilidade de aparecimento de anomalias congênitas e muitas dessas originam-se de

insuficiência na formação do tubo neural (VON RENKLINGHAUSEN, 1886 apud GUVENC et al 2013) ou reabertura após a formação do tubo neural (GARDNER, 1960).

Fatores ambientais que poderiam influenciar o desenvolvimento do conceito podem causar anomalias congênitas nesse período. O fator de risco mais conhecido para o defeito do tubo neural (DTN) é a deficiência materna de folato (AU, ASHLEY-KOCH, NORTHRUP, 2010; LO, POLŠEK, SIDHU, 2014). Outros fatores de risco para o desenvolvimento de DTN incluem histórico familiar positivo, tabagismo e poluição do ar (BEDFORD, 1972, PANDEY, UPADHYAY, 2012). Muitos estudos têm sido feitos em embriões de galinha para investigar a etiologia do DTN, sendo avaliado os efeitos de fatores ambientais (CETINKAL *et al.*, 2010, DALGIC *et al.*, 2009, GUVENC *et al.*, 2013, SIMSEK *et al.*, 2012, TEMIZ *et al.*, 2009, WHITSEL, JOHNSON, FOREHAND, 2002).

A febre alta na mãe durante o primeiro mês de gestação, o uso de álcool durante a gravidez e o uso de alguns fármacos antiepilepticos podem estar relacionados com etiologia dos defeitos de fechamento do tubo neural (TUNCBILEK, BODUROGLU, KASIFOGLU, 1999). Os estudos demonstraram que, em embriões com estágios iniciais de *Gallus gallus*, o etanol, meloxicam em altas doses, progesterona em altas doses, metotrexato de ácido fólico e cotinina incluída no cigarro causaram defeito de fechamento do tubo neural (BARUTCUOGLU *et al.*, 2001; DALGIC *et al.*, ERDINCLER *et al.*, 2006, VATANSEVER *et al.*, 2003).

O modelo de embrião de galinha em estágio de desenvolvimento inicial muitas vezes é o escolhido para pesquisas por se tratar de um ensaio ideal que corresponde ao primeiro mês de desenvolvimento embrionário em mamíferos, sendo adequado para a investigação de produtos químicos no desenvolvimento de embriões. Numerosos agentes químicos como a cafeína, fenitoína, diazepam e anestésicos locais são conhecidos por causar defeitos no tubo neural em embriões de galinha. (ERDINCLER *et al.*, 2006, GUNEY *et al.*, 1999, LEE, NAGELE, 1985). Tural Emon *et al.* (2015) mostraram que o benzoato de sódio, um dos conservantes alimentares amplamente utilizados, não possui efeito no desenvolvimento do tubo neural em embriões de galinha, mesmo em altas doses. No estudo em questão, foram utilizados embriões a partir do estágio 8 H.H em função da clara visibilidade dos somitos, permitindo classificar os embriões em estágios.

A literatura científica enfatiza as ações ansiolíticas e antidepressivas da Riparina III em estudos experimentais básicos (VASCONCELOS *et al.*, 2015; MELO, 2012; SOUSA *et al.*, 2004). Um estudo prévio utilizando modelos animais com depressão aguda

verificou a normalização do comportamento depressivo e um aumento adicional nos níveis de monoaminas (MELO *et al.*, 2013). Neste mesmo estudo foi verificado que a Riparina III foi capaz de aumentar os níveis de monoaminas NA, 5-HT e DA no estriado e no córtex pré-frontal, e NA e 5-HT no hipocampo, ao mesmo tempo que diminui seus metabólitos no estriado e no córtex pré-frontal. Além disso, a Riparina A, um composto obtido através da planta *Aniba riparia*, possui um potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias que possivelmente, segundo Medeiros *et al.* (2015), a Riparina III poderia ser usada como um antidepressivo e ansiolítico para mulheres durante a gravidez.

Na presente pesquisa, a investigação do efeito da Riparina III sobre a somitogênese e formação do tubo neural de *Gallus gallus* deverá ser aprofundada para melhor caracterizarmos a influência dessa substância no processo de gastrulação.

7 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho foi possível concluir que:

- Embriões de *Gallus gallus* expostos a Riparina III nas concentrações de 50 e 100 µg/mL apresentaram aumento no comprimento dos somitos quando comparados com o grupo controle.
- A largura do tubo neural variou com o uso de Riparina III, independente das concentrações estudadas (25, 50 e 100µg/ml).

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, I.A. Beilschmiedia Nees (Lauraceae) do Estado do Rio de Janeiro.
Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 59p, 1994.

ARAÚJO, F.L.O.; MELO, C.T.V.; ROCHA, N.F.M.; MOURA, B.A.; LEITE, C.P.; AMARAL, J. F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, DOI 10.1007/s00210-009-0433-9, 2009.

ARAÚJO É.J.F.; LIMA L.K.F.; SILVA O.A.; REZENDE JÚNIOR L.M.; GUTIERREZ S.J.C.; CARVALHO F.A.A.; LIMA F.C.A.; PESSOA C.; FREITAS R.M. (In Memoriam); FERREIRA P.M.P. In vitro antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkamides from *Aniba riparia*

(Lauraceae) VOL. 46(3): 309 - 314 **Acta Amaz.** 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201505436>,

AU KS, ASHLEY-KOCH A, NORTHRUP H. Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. **Dev Disabil Res Rev** 16:6-15,2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3053142/>

BARROSO, G.M.; GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. EDUSP, São Paulo, (1^a ed.), v.1., 255p, 1978.

BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R.; BARBOSA, R.C.S.B.C.; GIESBRECHT, A.M.; YOUNG, C.M. Benzoyl Esters and Amides, Styrylpyrones and Neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**., v. 26, p. 2615-7, 1987.

BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. The tyramines of *Aniba riparia*: transformation into models of natural products. **Ver. Latinoamr. Quim.**, v. 21, p. 5-7, 1990.

BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Cad.Farm.**, v. 13(2), p. 85-102, 1997.

BARUTCUOGLU M, SELCUKI M, VATANSEVER S, UMUR AS, İNAN S The effects of ethanol on neural tube development in early stage neural tube development chick embryos, *Türk Nörosirurji Dergisi* 11: 32-36, 2001. http://norosirurji.dergisi.org/pdf/pdf_TND_372.pdf

BATEMAN B, WARNER JO, HUTCHINSON E, DEAN T, ROWLANDSON P, GANT C, GRUNDY J, FITZGERALD C, STEVENSON J. The effects of a double blind, placebo controlled artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. **Arch Dis Child** 89:506-511, 2004. <http://adc.bmjjournals.org/content/89/6/506.full.pdf+html>

BEDFORD PGC, CLARKE EGC. Experimental benzoic acid poisoning in the cat. **Veterinary record** 90:53–58, 1972. <http://www.2ndchance.info/foodpreservatives-Bedford1972.pdf>

BRENT, R.L. The effects of embryonic and fetal exposure to x-ray, microwaves, and ultrasound. **Clin Perinatol.** Sep;13(3):615-48, 1986.

CARVALHO, A. A .T.; SAMPAIO, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; MELO, A .F .M.; SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A A; HIGINO, J. H. Atividade Antimicrobiana “*in vitro*” de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava L.* sobre bactérias Gram-negativas. **Acta Farm.Bonaerense**, 21 (4):255-8, 2002.

CASTELO-BRANCO, U.J.V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; BARBOSA-FILHO, J.M. **Atividade espasmolítica de benzamidas isoladas de Aniba riparia (Parte 1)**. Resumo VI Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Abstr. 6-69, 302, 1991.

CASTELO-BRANCO, U.J.V. **Estudos Farmacológicos do Éter Metílico de N-(2,6dihydroxibenzoyl)-tyramine.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 1992.

CASTELO-BRANCO, U.V.; CASTELO-BRANCO, U.J.V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; BARBOSA-FILHO, J.M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v.19(3), p. 197-202, 2000.

CATÃO, R.M.R; BARBOSA-FILHO, J.M; GUTIERREZ, S.J.C.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinhas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multiresistentes. **RABC**, v. 34 (4), p.247-249, 2005.

CONSERVA, A. M. **Constituintes químicos e ensaios farmacológicos de Aristolochia birastris Duchtre.** João Pessoa. (Mestrado em Produtos Naturais) Universidade Federal da Paraíba. 192p.1985.

DALGIC A, ARMAĞAN E, HELVACIOGLU F, OKAY O, DAGLIOGLU E, TAKE G, UNLU A, BELEN D. High dose cotinine may induce neural tube defects in a chick embryo model. **Turkish Neurosurgery** 19:224-229, 2009.

http://www.turkishneurosurgery.org.tr/pdf/pdf_JTN_671.pdf

DEBIASI, M.M. **Análise Morfológica da ação do Cloreto de Manganês durante o desenvolvimento embrionário inicial de Gallus gallus.** Monografia. Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2011.

ERDINCLER P, DALGIC A, CEPNI I, ERKAN S, KAFADAR A, TASYUREKLI M: The effects of high dose progesterone on neural tube development in early chick embryos: **Neurology India** 54(2): 178-181, 2006.

<http://www.bioline.org.br/pdf?ni06052>

EVANS, W.C. Orders and families of medicinal plants; animal-derived drugs. In: Evans, W.C. **Pharmacognosy.** (Ed.) Trease and Evans pharmacognosy. 14th ed. Philadelphia: wB Saunders, cap. 2, p.28-55, 1996.

FIRMO, W.C.A, COSTA, H.D.; MENDES, H.B.R.; GOSTINSKI, L.F.; DIAS, I.C.L.; SABBADINI, P.S.; NUNES, G.S. Antibacterial Activity of Medicinal Plants: an Exploration Technology. **Revista GEINTEC.** Vol. 4/n.5/ p.1564 -1573 1564. São Cristóvão/SE, 2014.

FONSECA E.T.; SILVA F.M.O.; ALCANTARA D.; CARDOSO R.C.; FRANCIOLLI A.L.; SARMENTO C.A.P.; FRATINI P.; FERREIRA A.J.P.; MIGLINO M.A. Embryonic Development of Chicken (*Gallus Gallus Domesticus*) From 1st to 19th Day- **Ectodermal Structures Microscopy Research and Technique** 00:00–00 DOI: 10.1002/jemt.22288, 2013.

https://www.researchgate.net/publication/256481546_Embryonic_Development_of_Chicken_Gallus_Gallus_Domesticus_From_1st_to_19th_Day-Ectodermal_Structures

GARCIA, S. M. L.; FERNANDEZ, C. **Embriologia**. 2^aedição. Artmed. Porto Alegre, 2006.

GARDNER WJ: Myelomeningocele, the result of rupture of the embryonic neural tube. **Cleve Clin Q** 27:88, 1960. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13826548>

GILBERT, SCOTT F. **Biologia do desenvolvimento**. 5^a edição. FUNPEC editora. Ribeirão Preto - SP, 2003.

GÓMEZ DUMM, CESAR. **Embriologia humana: Atlas e texto**. 1^a edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2006.

GUNEY O, SELCUKI M, UNLU A, BAGDATOGLU C. The effect of diazepam on the development of neural tube defects in early chick embryos. **Turkish Neurosurgery** 9: 44-7, 1999. http://www.turkishneurosurgery.org.tr/pdf/pdf_JTN_363.pdf

GUVENC Y, DALGIC A, BILLUR D, KARAOGLU D, AYDIN S, DAGLIOGLU E, OZDOL C, NACAR OA, YILDIRIM AE, BELEN D. The effects of levetiracetam on neural tube development in the early stage of chick embryos. **Turkish Neurosurgery** 23:617-622, 2013. http://www.turkishneurosurgery.org.tr/pdf/pdf_JTN_1202.pdf

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. **A series of normal stages in the development of the chick embryo**. Journal of Morphology, v.88, p.49-92, 1951.

HOFER, O.; GREGER, H.; ROBIEN, W.; WERNER, A. ¹³C NMR and ¹H lanthanide induced shifts of naturally occurring alkamides with cyclic amide moieties: amides from *Achillea falcata*. **Tetrahedron Lett**, v. 42, p. 2707–2716, 1986.

JOSHI S.C, VERMA A.R, MATHELA C.S. **Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species**. Food Chem Toxicol. 48:37–40, 2010.

LEE H, NAGELE RG Neural tube defects caused by local anaesthetics in early chick embryos. **Teratology** 31: 119–127, 1985. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tera.1420310114/pdf>

MARQUES, C.A. Importância econômica da família Lauraceae. **Lindl. Florest. e ambiente**, v.8 (1), p.195-206, 2001.

MATA, R.; MORALES, J.; PÉREZ, O.; RIVERO-CRUZ, I.; ACEVEDO, L.; ENRIQUESMENDOZA, I.; BYE, R; FRANZBLAU, S.; TIMMERMANN, B.J. Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. **Nat. Prod.**, v. 67, p. 19-61, 2004.

MATOS, E. C. **Avaliação dos efeitos tóxicos de timbó (*ateleia glazioviana*) no desenvolvimento embrionário de galinha doméstica (*gallus domesticus*)**. Trabalho de graduação (bacharel em Ciências Biológicas), Setor Área de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina. Joaçaba-SC, 2009.

MEDEIROS, J.V.R.; SILVA, R.O.; DAMASCENO, S.R.B.; SILVA, I.S.; SILVA, V.G.; BRITO, C.F.C.; TEIXEIRA, A. E. A.; NUNES, G.B.L.; CAMARA, C.A.; BARBOSA-FILHO, J.B.; GUTIERREZ, S.J.C.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.L.P.;

BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. *Chemico-Biological Interactions* 229, pages 55-63, 2015.

MELO, C.T.; MONTEIRO, A.P.; LEITE, C.P.; ARAÚJO, F.L.; LIMA, V.T.; BARBOSAFILHO, J.M.; FRANÇA FONTELES, M.M.; DE VASCONCELOS, S.M.; DE BARROS VIANA, G.S.; DE SOUSA, F.C. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Biol Pharm Bull.*, v.29 (3), p.451-454, 2006.

MELO, Carla Thiciane Vasconcelos de. **Investigação do efeito antidepressivo da riparia III: alterações comportamentais, neuroquímicas e avaliação do estresse oxidativo.** 2012. Tese (doutorado). Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2012. http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/4783/1/2012_tese_ctvmelo.pdf

MELO, C. T. V.; CARVALHO, A. M. R. DE; MOURA, B. A.; TEIXEIRA, C. P. L.; VASCONCELOS, L. F.; FEITOSA, M. L.; OLIVEIRA, G. V. DE; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; FONTELES, M. M. DE F.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, F. C. F. DE. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Volume 27, Issue 1, pages 104–112, February 2013. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-8206.2011.00968.x/full>

MOORE KEITH L; PERSAUD T.V.N. **Embriologia Clínica**, 8^a edição. Elsevier. Rio de janeiro, 2008.

NUNES G.B.L.; COSTA L.M.; GUTIERREZ S.J.C.; SATYAL P.; FREITAS R.M. Behavioral tests and oxidative stress evaluation in mitochondria isolated from the brain and liver of mice treated with riparin A. **Life Science**. Volume 121, 15 January, Pages 57–64, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.11.018>
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320514009394>

OLIVEIRA, R. A. G. **Ação farmacológica sobre o sistema nervoso central de alcalóides da Solanum pseudo-quina St. Hil.** João Pessoa (Mestrado Produtos Naturais). Universidade Federal da Paraíba. 97p. 1986.

PANDEY RM, UPADHYAY SK. **Food additive.** In: El-Samragy Y (ed), *Food Additive*. <http://www.intechopen.com/books/ food- additive/food-additive 1-30>, 2012. <http://cdn.intechweb.org/pdfs/28906.pdf>

RIVERO, L. B. D. **Exposição de embriões de gallus domesticus ao acetato de chumbo e seus efeitos sobre a histologia cerebelar e o comportamento no período pós-natal.** Dissertação programa de pós-graduação Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis- SC, 2005.

RIVERO, L. B. D. O, SCHATZ J. C., CARVALHO M. S. L., DE CARVALHO M. C.; RAUH MÜLLER Y. M. **Ação do acetato de chumbo sobre o padrão de desenvolvimento de embriões de *gallus domesticus*.** Florianópolis, SC. J. Braz. Soc. Ecotoxicol. v. 1, n.1, p 83-87, 2006.

ROHWER, J.G. Prodromus einer monographie der Gattung Ocotea Aublet (Lauraceae), sensu lato. **Mitt. Allg. Bot. Hamburg**, v. 20, p. 3-278, 1986.

SADLER, T.W. Langman **Embriologia Médica**. 9^a edição. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2005.

SEIXAS, S.R.S. Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiopressora. João Pessoa. **Dissertação de Mestrado**. Mestrado em Produtos Naturais. Universidade Federal da Paraíba. 103p. 1996.

SIMSEK H, COLAK A, KAYA S, KUTLAY M, CETINKAL A, HAHOLU A, DEMIRCAN MN. The effects of Diesel exhaust particles on neural tube development in the early stage chicken embryo. **Turk Neurosurg**, 22:77-82, 2012.

http://www.turkishneurosurgery.org.tr/pdf/pdf_JTN_944.pdf

SINGH, S.K.; PRASAD, A.K.; OLSEN, C.E.; JHA, A.; JAIN, S.C.; PARMAN, V.S.; WENGEL, J. Neolignas and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1355, 1996.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; MONTEIRO, A.P.; LIMA, V.T.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; PEREIRA, B.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.F.; VIANA, G.S.B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. Volume 78, Issue 1, May, Pages 27–33, 2004.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305704000358>

SOUSA, F.C.F.; MONTEIRO, A.P.; MELO, C.T.V.; OLIVEIRA, G.R.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v.19, p.1005-1008, 2005.

SOUSA, F.C.F.; LEITE, C.P.; MELO, C.T.V.; ARAÚJO, F.L.O.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M; VIANA, G.S.B. Evaluation os effects of N-(2-hidroxy benzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in anxiety models in mice. **Biol. Pharm. Bull**, v.30 (7), p.1212-1216, 2007.

TEIXEIRA, C.P.; DE MELO C.T.; DE ARAÚJO, F.L.; DE CARVALHO, A.M., SILVA, M.I.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MACÊDO, D.S.; DE BARROS VIANA, G.S.; DE SOUSA, F.C. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundam Clin Pharmacol**. doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.00973.x., 2011.

TEMIZ C, TEMIZ P, DEMIREL A, SAYIN M, UMUR AS, OZER FD. Effect of sodium phenytoin concentration on neural tube development in the early stages of

chicken embryo development. **J Clin Neurosci** 16:307-331, 2009. [http://www.jocn-journal.com/article/S0967-5868\(08\)00036-2/pdf](http://www.jocn-journal.com/article/S0967-5868(08)00036-2/pdf)

THOMAS, G.; CASTELO-BRANCO, U.J.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B.B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea pig alveolar leucocytes. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46; p. 103-7, 1994.

TORRES, J.M.; CHAVEZ, A.G. Secamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y perspectiva**, v. 20, p. 377-387, 2001.

TUNCBILEK E, BODUROGLU K, KASIFOGLU AM: Neural tube defects in Turkey: Prevalence, distribution and risk factors. **Turk J Pediatr** 41: 299- 305, 1999. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770089>

TURAL EMON S., ORAKDOGEN M., USLU S., SOMAY H. Effects of the Popular Food Additive Sodium Benzoate on Neural Tube Development in the chicken embryo. **Turk Neurosurg**, Vol: 25, No: 2, 294-297, 2015.
http://www.turkishneurosurgery.org.tr/pdf/pdf_JTN_1502.pdf

UNLU A. Methods of developmental research. **Acta Neurochir** 83: 71-78, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12442624>

VASCONCELOS, A.S.; OLIVEIRA, I.C.M.; VIDAL, L.T.M.; RODRIGUES, G.C.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; GASPAR, D.M.; SOUSA, F.C.F. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique - **Fundamental & Clinical Pharmacology** 29, pages 394-403, 2015.

VATANSEVER HS, UMUR S, UNAN VS, SELCUKI M. The effects of methotrexate on the development of neural tube defects in the chick embryo. **TÜBİTAK; Turk J Vet Anim Sci** 27:1119-1125, 2003.

https://www.researchgate.net/publication/259620226_The_Effects_of_Methotrexate_on_the_Development_of_Neural_Tube_Defects_in_the_Chick_Embryo

VEIGA-JUNIOR V.F, MELLO J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn** 18: 464-471, 2008.

VICENTINI, A.; WERFF, H.V.D.; NICOLAU, S. **Lauraceae**. In: Flora da Reserva Ducke – Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Edited by RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M; SOUZA, M.A.D; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C., SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. Manaus: INPA – DFID, v. 1, p. 150-179, 1999.

VON RENKLINGHAUSEN E: Untersuchungen über die spina bifida. **Arch Pathol Anat** 105:243-373, 1886.

WAGENINGEN, N. V. *et al.* A incubação de ovos por galinhas e na incubadora. Fundação agromisa, 2004. Disponível em: <http://anancy.net/documents/file_pt/34-p2004_screen.html>. Acesso 30/05/11.

WILLIAMS, P.M.; FLETCHER, S. Health Effects of Prenatal Radiation Exposure. **American Family Physician** Vol. 82, 488-493, 2010.
<http://www.aafp.org/afp/2010/0901/p488.pdf>

WHITSEL AI, JOHNSON CB, FOREHAND CJ: An in ovo chicken model to study the systemic and localized teratogenic effects of valproic acid. **Teratology** 66:153-163, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12353211>

WOLPERT. L. *et al.* **Princípios de Biologia do Desenvolvimento.** 1^a edição, Artmed, Porto Alegre, 2000.

YAMAMOTO, FLÁVIA YOSHIE. **Padronização de metodologias aplicadas ao estudo da exposição de embriões de aves a contaminantes ambientais.** Trabalho de graduação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2009.

ANEXO

Carta de Aprovação do Comitê de Ética para Pesquisa


 Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
 fax: (55 81) 2126 8350
[www.ccb.ufpe.br](http://ccb.ufpe.br)

Recife, 31 de julho de 2015

Ofício nº 73/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: Prof.^a Eliete Cavalcante da Silva
 Departamento de Histologia e Embriologia
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.022496/2015-89

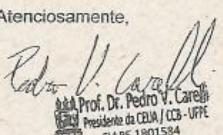
Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado “Caracterização Morfológica de Embriões de *Gallus gallus domesticus* L., expostos a produtos naturais e sintéticos bioativos com ênfase no desenvolvimento dos sistemas nervoso e cardiovascular”.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério comercial localizado em moreno é (ovos incubados); Animais: aves; Linhagem: *Gallus gallus domesticus*; Idade: serão embrião com 72 horas; O projeto vai usar 800 ovos em três anos.

Atenciosamente,

 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
 Presidente da CEUA / CCB-UFPE
 UFPE
 SIAPE 1801584