

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Efeito do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o  
desenvolvimento embrionário em fêmeas Wistar.**

CLEOPATRA REGINA DA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. NICÁCIO HENRIQUE DA SILVA  
CO-ORIENTADOR: PROFa. Dra. NOEMIA PEREIRA DA SILVA SANTOS

RECIFE, 2014

CLEOPATRA REGINA DA SILVA

**Efeito do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o desenvolvimento embrionário em fêmeas Wistar.**

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Recife, 2014

Catlogação na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Silva, Cleopatra Regina da**  
**Efeito do ácido úsnico purificado da *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o desenvolvimento embrionário em fêmeas wistar/ Recife: O Autor, 2014.**

**61 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Nicácio Henrique da Silva**

**Coorientador: Noemia Pereira da Silva Santos**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2014.**

**Inclui bibliografia e anexos**

1. Ácidos 2. Organogênese 3. Cladonia I. Silva, Nicácio Henrique da (orientador) II. Santos, Noemia Pereira da Silva (coorientadora) III. Título

**572**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2014- 246**

CLEOPATRA REGINA DA SILVA

**Efeito do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o desenvolvimento embrionário em fêmeas Wistar.**

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

---

Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva (Presidente)

---

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

---

Profa. Dra. Mônica Cristina Barroso Martins

---

Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira

Aprovado em: 24/02/14

Dedico este trabalho a minha família que com toda a paciência e amor esteve ao meu lado.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter me mostrado o caminho certo quando tudo parecia perdido e com sua imensa misericórdia me fez conhecer verdadeiros anjos na terra durante esses dois anos.

Ao professor Dr. Nicácio que me fez crescer mostrando a verdadeira postura de um pesquisador dedicado aos seus alunos e sempre visando à construção do conhecimento científico.

A professora Dra. Noemia pela confiança que depositou em meu trabalho mesmo sem me conhecer, durante esses quatro anos de convivência e pesquisas científicas enriqueceu tanto o lado profissional como pessoal.

A Dra. Mônica que com paciência e muito carinho me acompanhou em todas as etapas do desenvolvimento desse estudo sempre com sugestões pertinentes para o aperfeiçoamento do trabalho.

A minha família que é a essência do que sou, meu caráter, compromisso e persistência. Todas as palavras do mundo não seriam o suficiente para expressar todo o amor que sinto, esse mestrado é fruto da dedicação de vocês. Obrigada por sempre está ao meu lado investindo na minha educação e suportando muitas vezes a minha impaciência. Ao nosso amor Davi que chegou para unir ainda mais a nossa família, seu sorriso renova minhas energias e me faz esquecer até o significado da palavra problema.

A equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais onde passei bons momentos de descontração e muita produção.

Ao Técnico de Laboratório Sr. João Virgínio agradeço pelos ensinamentos que tornaram possível a realização deste trabalho. Obrigada pela dedicação e palavras de conforto.

Ao Centro Acadêmico de Vitória minha segunda casa onde iniciei com a graduação e fui novamente acolhida no mestrado. Equipe maravilhosa de professores e técnicos que me deram suporte para a concretização desse trabalho.

Aos professores Drs. Francisco e Katharine pelos ensinamentos e apoio da parte histológica, como bons profissionais sempre exigentes para obter um padrão de qualidade nos experimentos. Levarei tudo isso para minha vida profissional.

A equipe de Biotecnologia e Fármacos pelos momentos de crescimento acadêmico e apoio pessoal.

As guerreiras da iniciação científica Ábina, Andreza, Daniele, Geane e Natália pela dedicação ao desenvolvimento desse estudo, mesmo com provas e trabalhos da graduação me deram total suporte.

Aos meus queridos mestrandos onde a persistência, motivação, amor, elegância, seriedade, compromisso, positividade e loucura tornou mais leve essa caminhada.

Aos meus amigos Bruna e Thiago que a diferença de personalidade me fez reavaliar com vejo o mundo.

A Igreja de Cristo uma família que fui adotada com muito amor, a cada dia me faz crescer espiritualmente. Muitas vezes sem saber das minhas aflições me faziam viver momentos que renovava minhas forças.

Aos meus estimados Amigos agradeço a compreensão da minha ausência, obrigada pelas vibrações positivas e por acreditarem nos meus sonhos.

A Porfa. Dr. Patrícia e a Djalma pelo incansável apoio a nós mestrandos sempre nos incentivando para o crescimento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Comitê de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES) e ao Fundo de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro durante o período do curso de Pós-Graduação.

“Tudo que é verdadeiro, tudo que é respeitável, tudo que é justo, tudo que é puro, tudo que é amável, tudo que é de boa fama, se alguma virtude há e se algum louvor existe, seja isso que ocupe o vosso pensamento.”  
(Filipenses 4:8).

## RESUMO

O ácido úsnico é um dibenzofurano produzido por algumas espécies de líquens e possui várias propriedades farmacológicas, tais como: antiviral, antimicrobiana, antiinflamatória e antitumoral. Embora essa substância líquênica apresente estas propriedades a sua utilização em terapia está limitada pela sua hepatotoxicidade. O período de gestação é uma das fases mais sensíveis do ciclo reprodutivo. Durante este período, a maioria dos agentes atravessa facilmente a placenta e, portanto, pode-se considerar que a exposição materna a química se artificial ou naturalmente produzido, pode resultar em efeitos adversos no organismo passivo. Ensaio pré-clínicos sobre o ciclo reprodutivo são necessários para novas moléculas, pois determinam situações que podem ocasionar potenciais riscos para a reprodução humana de ordem maior, menor ou igual àquelas visualizadas em modelos experimentais. Esse estudo teve o objetivo de investigar o potencial toxicológico do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* (ATHI) em ratas Wistar durante o período da organogênese. 18 fêmeas foram submetidas ao estudo do ciclo estral no intuito de se determinar o período fértil. Em seguida as ratas foram pareadas com 9 machos (2:1), após a confirmação da gestação, foram distribuídas aleatoriamente nos grupos controle (n=6), tratado I (n=6) e tratado II (n=6). As fêmeas do grupo controle receberam solução fisiológica e as dos grupos tratados receberam o ácido úsnico purificado nas doses de 15 mg/kg e 25 mg/kg, respectivamente. Ao 20º dia as fêmeas foram sacrificadas por overdose de anestésico Urethane (1,25 g/kg). O peso dos fetos e suas placentas foram mensurados e em seguida foi retirado o fígado para análise histológica. As implantações foram identificadas por Lugol. Nas fêmeas tratadas com o ácido úsnico purificado nas doses de 15 e 25 mg/kg o número de reabsorções foi maior  $3,5 \pm 0,5$  e  $5 \pm 1$ , respectivamente quando comparada com o grupo controle  $1,1 \pm 0,4$ . Foi observada uma redução no número de feto viáveis  $10 \pm 1,03$  e  $8 \pm 1,4$  nas fêmeas tratadas com o ácido úsnico purificado nas doses de 15 e 25 mg/kg, respectivamente quando comparado com o grupo controle  $12 \pm 0,51$  e redução no peso corporal dos fetos onde o controle apresentou  $5,7 \pm 0,3$  e  $4,1 \pm 0,1$  e  $3,5 \pm 0,1$  para os tratamentos com 15 e 25 mg/kg, respectivamente. Na dose de 25 mg/kg os fetos apresentaram alterações morfológicas como exposição do globo ocular, presença de uma massa celular na região superior do feto e atrofia dos membros superiores e inferiores, porém essas alterações não foram observadas na dose de 15 mg/kg. O peso médio dos fígados de fetos das fêmeas tratadas com ácido úsnico purificado a 15 mg/kg foi evidenciado uma leve redução  $0,34 \pm 0,02g$  quando comparado ao grupo controle  $0,5 \pm 0,02g$ . Por outro lado uma relevante diminuição  $0,2 \pm 0,05g$  foi observado no grupo tratado na dose de 25 mg/kg. Na análise histológica do fígado do grupo de fetos das fêmeas tratados com ácido úsnico purificado na dose de 15 mg/kg foi observado uma leve redução não significativa na quantidade de megacariócitos comparado ao grupo controle, já para a dose de 25 mg/kg os megacariócitos apresentaram uma redução significativa por campo analisado, quando comparado ao grupo controle. A histomorfometria do fígado da prole em relação ao número total de hepatócitos quando administrado a dose de 15 mg/kg não mostrou alteração significativa na média de células quando comparado ao grupo controle, no entanto a dose de 25 mg/kg foi visualizado um aumento significativo no número médio de hepatócitos. O modelo experimental utilizado no presente estudo demonstrou que o composto apresentou toxicidade no período da organogênese onde a dose mais tóxica foi a de 25 mg/kg. A dose de 15 mg/kg é uma candidata a novos estudos experimentais. Estes estudos revelam a importância de se avaliar os efeitos tóxicos de substâncias naturais a fim de elucidar os cuidados na sua utilização ou indicação com potencial fármaco.

Palavras-chaves: Ácido Úsnico, Organogênese, Toxicidade Reprodutiva

## ABSTRACT

The usnic acid is a dibenzofurans produced by some species of lichen and has various pharmacological properties, such as antiviral, antimicrobial, antiinflammatory and antitumor. While this lichenic substances exhibits those properties their use in therapy is limited by hepatotoxicity. The gestation period is one of the most sensitive phases of the reproductive cycle. During this period, the majority of agents readily crosses the placenta and can therefore be considered that maternal exposure to artificial or natural chemical is produced may result in adverse effects on passive body. Preclinical trials on the reproductive cycle are necessary for new molecules, because it determines situations that can cause potential risks to human reproduction higher, lower or equal order to those visualized in experimental models. This study aimed to investigate the toxicological potential of usnic acid purified from *Cladonia substellata* (AHTI) in Wistar rats during the period of organogenesis; 18 females were subjected to the study of the estrous cycle with the aim determine the fertile period. Then the rats were paired with a 9 males (2:1), after the confirmation of pregnancy, were randomly distributed in control (n = 6), I treated (n = 6) and treated II (n = 6) groups. The females of the control group received saline and treated groups received the purified usnic acid at a doses of 15 mg/kg and 25 mg/kg, respectively. By day 20 the female rats were sacrificed by anesthetic overdose Urethane (1,25 g/kg). The weight of fetuses and their placentas were measured and then the liver was removed for histological analysis. The deployments were identified by Lugol. In females treated with purified usnic acid at doses of 15 and 25 mg/kg was largest the number of resorptions  $3,5 \pm 0,5$  and  $5 \pm 1$  respectively compared with control group  $1,1 \pm 0,4$ . Was observed a reduction in the number of viable fetuses  $10 \pm 1,03$  and  $8 \pm 1,4$  in females treated with purified usnic acid at doses of 15 and 25 mg/kg, respectively as compared with the control group and  $12 \pm 0,51$  reduction in body weight of fetuses where control had  $5,7 \pm 0,3$  and  $4,1 \pm 0,1$  and  $3,5 \pm 0,1$  in the treatment with 15 and 25 mg/kg, respectively. At a dose of 25 mg/kg fetuses exhibited morphological changes such as exposure of the eye, the presence of a cellular mass in the upper region of the fetus and atrophy of upper and lower limbs, these changes were not observed in the dose 15 mg/kg. The mean weight of the liver of fetuses of females rats treated with 15 mg/kg to purified usnic acid was shown a slight decrease  $0,34 \pm 0,02g$  compared with the control group  $0,5 \pm 0,02g$ . On the other hand a significant decrease  $0,2 \pm 0,05 g$  was observed in the treated group at a dose of 25 mg/kg. The histological analysis of the liver of the group of fetuses from females treated with purified usnic acid at a dose of 15 mg/kg was seen a slight non-significant reduction in the number of megakaryocytes in the control group, while for the dose of 25 mg/kg megakaryocytes exhibited a significant reduction of analyzed field compared to the control group. Histomorphometry of the liver of the offspring relative to the total number of hepatocytes when administered a dose of 15 mg/kg showed no significant change in mean cell when compared to the control group, but the dose of 25 mg/kg was displayed a significant increase in the number average hepatocytes. The experimental model used in this study showed that the compound showed toxicity during the organogenesis where the was more toxic dose of 25 mg/kg. The dose of 15 mg/kg is a candidate for new experimental. These studies demonstrate the importance of evaluating the toxic effects of natural substances to elucidate the care in its use or potential drug indication.

Keywords: Organogenesis, Reproductive Toxicity, Usnic Acid.

## LISTA DE FIGURAS

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

	Página
<b>Figura 1.</b> Estrutura do talo liquênico.	14
<b>Figura 2.</b> Classificação dos líquens. 2A- crostoso, 2B- folioso, 2C- fruticoso, 2D- filamentoso, 2E - dimórfico.	15
<b>Figura 3.</b> Medicamento obtido a partir do líquen <i>Cetraria islandica</i> (L.).	17
<b>Figura 4.</b> Utilização de líquen em cosméticos. 4A <i>Evernia prunastri</i> (L.); 4B Perfume Francês.	17
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do ácido úsnico.	20
<b>Figura 6.</b> Fase da reprodução dos mamíferos.	24
<b>Figura 7.</b> Efeitos da exposição materna a compostos químicos durante a gestação.	25
<b>Figura 8.</b> Pesquisas científicas sobre atividades biológicas e toxicidade do ácido úsnico.	27

### ARTIGO

	Página
<b>Figura 1.</b> Pesquisas científicas sobre atividades biológicas e toxicidade do ácido úsnico.	48
<b>Figura 2.</b> Fetos obtidos dos grupos experimentais: 2A= Grupo Controle, 2B= Grupo Tratado dose 25 mg/kg setas mostrando embriões com interrupção no desenvolvimento, 2C= Grupo Tratado 25 mg/kg apresentando redução no número de fetos viáveis.	49
<b>Figura 3.</b> Feto obtido de fêmea tratada com ácido úsnico purificado na dose 25 mg/kg apresentando uma interrupção no desenvolvimento embrionário: 3A= Massa em desenvolvimento, 3B= Placenta.	50
<b>Figura 4.</b> Malformações nos fetos obtidos de fêmeas tratadas com ácido úsnico purificado: 4A= seta mostrando a protrusão do globo ocular, 4B= Seta mostrando massa celular na região superior do feto, 4C= Setas mostrando atrofia dos membros superiores e inferiores.	50
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografia do fígado da prole dos grupos experimentais: Visualização dos cordões de hepatócitos (seta), os capilares sinusóides (asteriscos), células da linhagem eritrocitária (cabeça da seta) 5A= Grupo Controle, 5B= Grupo Tratado 15 mg/kg com quantidade de hepatócitos semelhante ao grupo controle, 5C= Grupo Tratado 25 mg/kg é observado uma maior quantidade de hepatócitos quando comparado ao Grupo Controle e o Tratado com 15 mg/kg, Coloração Tricômico de Manson. Aumento 400X.	51

- Figura 6.** Fotomicrografia do fígado da prole dos grupos experimentais: Visualização dos megacariócito (seta) 6A= Grupo Controle, 6B= Grupo Tratado 15 mg/kg redução, não significativa, na quantidade de megacariócito, 6C= Grupo Tratado 25 mg/kg redução significativa na quantidade de megacariócito quando comparado ao grupo controle 15 mg/kg, Coloração Tricômico de Manson. Aumento 400X. 52
- Figura 7.** Análise da média dos hepatócitos nos grupos experimentais. Dados expressos com média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA-Tukey. \*\*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. 53
- Figura 8.** Análise da média dos megacariócitos nos grupos experimentais. Dados expressos com média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA-Tukey. \*\*\*p<0,001 tratamento de 25mg/kg comparado ao Grupo Controle. 53

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

	Página
<b>Tabela 1.</b> Variáveis reprodutivas das fêmeas entre 0° e 20° dia de gestação tratadas com ácido úsnico purificado nas doses 15 e 25 mg/kg.	54
<b>Tabela 2.</b> Efeito do ácido úsnico purificado sobre os parâmetros fetais.	55

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. Fundamentação Teórica</b>	
<b>1.1 Líquen</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Ácido Úsnico</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Avaliação da toxicidade reprodutiva</b>	<b>23</b>
<b>2. Referências Bibliográficas</b>	<b>29</b>
<b>3. Objetivos</b>	
<b>3.1 Geral</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Específicos</b>	<b>33</b>
<b>4. Artigo - Efeito do ácido úsnico purificado de <i>Cladonia substellata</i> (AHTI) sobre o desenvolvimento embrionário em fêmeas Wistar.</b>	<b>34</b>
<b>Resumo</b>	<b>36</b>
<b>Abstract</b>	<b>36</b>
<b>Introdução</b>	<b>37</b>
<b>Metodologia</b>	<b>38</b>
<b>Resultados</b>	<b>40</b>
<b>Discussão</b>	<b>42</b>
<b>Referências</b>	<b>45</b>
<b>5. Conclusões</b>	<b>56</b>
<b>6. Anexos</b>	
<b>Norma da Revista – Reproductive Sciences</b>	<b>57</b>
<b>Comitê de Ética</b>	<b>61</b>

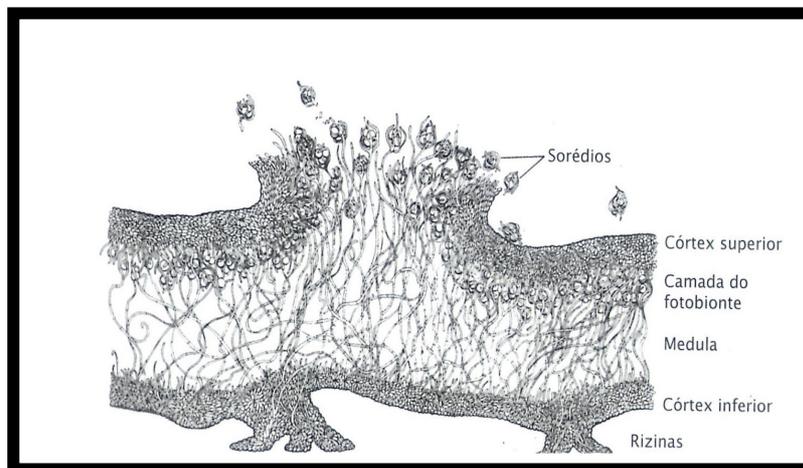
## 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1 LÍQUEN

Líquens são organismos formados pela associação entre fungo (micobionte) com uma ou mais alga e/ou cianobactéria (fotobionte). Apresentam ampla distribuição geográfica habitando dos trópicos aos pólos, sendo encontrados sobre rochas, solos e troncos de árvores (MULLER, 2001).

A estrutura do talo liquênico (Figura 1) 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).

**Figura 1.** Estrutura do talo liquênico.



Fonte: (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2010)

Os líquens são classificados em crostosos (Figura 2A), foliosos (Figura 2B), fruticosos (Figura 2C), filamentosos (Figura 2D) e dimórficos (Figura 2E). O líquen do tipo crostoso está aderido, ao substrato sobre o qual se desenvolve, através de estruturas semelhantes a raízes denominadas rizinas. Os foliosos tem sua estrutura que se assemelha a folhas. Os fruticosos tem seu desenvolvimento que lembra a estrutura de um fruto. Os filamentosos possuem estrutura com o formato de filamentos. Já os dimórficos tem seus tamanhos e

formatos variados sendo encontrados em diversos tipos de substratos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2010).

**Figura 2.** Classificação dos líquens. 2A- crostoso, 2B- folioso, 2C- fruticoso, 2D- filamentoso, 2E - dimórfico.



*Haematomma africanum* (J. Steiner) C.W. Dodge



*Baeomyces placophyllus* Ach.



*Cladia retipora* (Labill.) Nyl.



*Cladonia mitis* Sandst.



*Cladonia didyma* (Fée) Vain.

Desta associação 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, fumarprotocetrárico, salazínico, lecanórico, etc. (CULBERSON, 1972; NASH III, 1996). Estes produtos extracelulares são os responsáveis pela maioria das atividades biológicas e ambientais dos líquens (MULLER, 2001).

Os metabólitos secundários desempenham papel importante no ambiente, seja contribuindo para o desgaste das rochas seja como indicador ambiental (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2010). Devido ao fato de não terem mecanismos de excreção dos elementos que absorvem, alguns líquens são excelente modelo para o estudo da bioacumulação de metais pesados. Branquinho et. al. (2011) avaliaram o comportamento de diferentes espécies de líquens quanto ao acúmulo de cobre (Cu). As espécies utilizadas foram: *Ramalina pusilla* Duby, *Parmotrema hypoleucinum* (J.Steiner) Hale, *Ramalina canariensis* J.Steiner, *Usnea rubicunda* Stirt., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Parmotrema perlatum* (Huds.) M.Choisy, *Peltigera praetextata* (Sommerf.) Zopf, *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale e *Cladonia rangiformis* (L.). Apesar das diferenças no fotobionte, no crescimento e na necessidade de nutrientes, os espécimes apresentaram uma diminuição na absorção do potássio (K) e alterações no metabolismo do micobionte.

Estudos com a exposição do líquen ao mercúrio (Hg) demonstraram alteração no metabolismo energético em relação à produção de polipeptídeos, variações de concentração de pigmentos e modificações na estrutura do cloroplasto do fotobionte (NICOLARDI, et. al., 2012). Além da participação na sucessão ecológica e monitoramento ambiental existe registro da utilização de líquens na alimentação (IVANOVA; IVANOV, 2009), medicamentos e perfumes (PODTEROB, 2008).

Na alimentação humana, no século 19 nos países como: Escandinávia, Islândia, Grã-Bretanha e Rússia, a *Cetraria islandica* (L.) era embebida em água, cozida até secura, triturada e misturada na farinha para fazer pão. Este líquen foi extensivamente utilizado para o preparo do pão, que se tornou escasso, ficando proibido a sua utilização para outros fins a menos que fosse para ser usado na alimentação humana. A *Cetraria ericetorum*

Opiz, era triturada pelos esquimós e adicionada para aromatizar vários tipos de sopas (IVANOVA; IVANOV, 2009).

A *Cetraria islandica* (L.) está incluída na lista de plantas medicinais da Bielorrússia. É utilizada na forma medicinal que incluem infusões e chás. Como medicamentos foram desenvolvidas cápsulas (Figura 3) que contêm extratos de *Cetraria islandica* (L.) sendo utilizadas em doenças respiratórias como a asma (PODTEROB, 2008).

A *Evernia prunastri* (L.) (Figura 4A) é uma espécie de líquen, também conhecida como musgo do carvalho que pode ser encontrada em muitas florestas temperadas montanhosas no hemisfério norte, incluindo partes da França, Portugal e Espanha. Essa espécie é valiosa para perfumaria francesa sendo utilizada como fixador de perfume (Figura 4B) (PODTEROB, 2008).

**Figura 3.** Medicamento obtido a partir do líquen *Cetraria islandica* (L.).



Fonte: <http://www.healthstore.uk.com/p66693/bio-health-iceland-moss-60-capsules.html>. Acesso em 10.12.2013

**Figura 4.** Utilização de líquen em cosméticos. 4A *Evernia prunastri* (L.); 4B Perfume Francês.



Fonte: <http://www.sniffapaloozamagazine.com/UBARANDDIAREVIEWBYSUZZANNE.html>. Acesso em 10.12.2013

Importantes propriedades biológicas são relatadas utilizando as substâncias liquênicas como antifúngica (SHAHI; SHAHI; UPRETI, 2011), antioxidante (MELO et. al., 2011), antitumoral (RUSSO et. al., 2012) e antibacteriana (RANKOVIĆ; MISIĆ; SUKDOLAK, 2008).

Extrato aquoso de *Peltigera paraetaxtala* foi testado em humanos com diferentes concentrações, contra fungos patogênicos (dermatófitos), *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii*, *M. nanum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. violaceum* e *T. tonsurans*; o extrato mostrou-se com ação fungistática para todos os microrganismo na concentração de 40 µl/mL, enquanto as concentrações fungicidas mínimas (CCMs) foram de 60 µl/mL contra fungos patogênicos humanos. O extrato manteve sua toxicidade mesmo até 24 meses de armazenamento. Além disso, o extrato não apresentou qualquer efeito adverso sobre a pele dos mamíferos até à concentração de 10%. (SHAHI; SHAHI; UPRETI, 2011).

Além disso, o extrato de *P. paraetaxtala* foi formulado sob a forma de pomada e testado clinicamente na Faculdade de Medicina da Índia, os 30 pacientes que foram selecionados utilizaram a pomada duas vezes por dia durante 3 semanas. Ao final do tratamento 35% dos pacientes estavam completamente recuperados, 40% mostraram uma melhoria significativa da doença causada por fungos dermatófitos. Não foram observados retorno da patologia após dois meses do fim do tratamento. A pomada mostrou-se rentável, e apresentou vida útil longa e ausência de quaisquer efeitos adversos. Assim, pode ser usado como uma potencial fonte de agente antifúngico após sofrer ensaios clínicos multicêntricos bem sucedidos (SHAHI, SHAHI, UPRETI, 2011).

Melo et. al. (2011), evidenciaram que a atranorina composto isolado de *Cladina kalbii* atua como um agente antioxidante removendo diversos radicais livres como hidroxila, peróxido de hidrogênio, superóxido e óxido nítrico. A atranorina não foi citotóxica e protegeu as células SH-SY5Y (célula neuroblastoma) contra as perturbações de viabilidade celular induzida por água oxigenada. Esses resultados sugerem que a substância liquênica tem uma ação redox-ativo relevante, atuando como um pré-oxidante ou antioxidante, além disso, parece exercer efeitos citoprotetor em células sob estresse oxidativo induzido por água oxigenada.

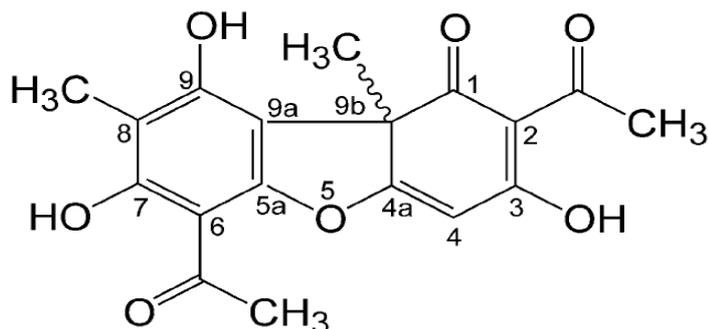
Com o objetivo de identificar novos compostos naturais com atividade anticrescimento e apoptótico em câncer de próstata, Russo et. al. (2012) avaliaram o efeito de cinco metabólitos secundários de líquens, foram eles: atranorina, e os ácidos difractáico, divaricático, vicanicina e protoliquesterínico. As substâncias liquênicas atranorina, e os ácidos divaricático e difractáico mostraram uma baixa atividade de inibição em células do câncer de próstata, apenas em concentrações elevadas entre 25 e 50  $\mu\text{M}$  essas substâncias exibiram melhor atividade. Quando comparado aos compostos vicanicina e ácido protoliquesterínico que apresentaram uma relação dose - resposta com concentrações a partir de 6,25  $\mu\text{M}$ , onde foi observada uma alta inibição da proliferação celular e a ativação do processo apoptótico.

A apoptose induzida por estes compostos parecem ser mediados através da inibição da expressão da proteína Hsp70, que está correlacionada com uma modulação de mecanismos das células do sistema imunológico. A combinação de vicanicina e do ácido protoliquesterínico com outras terapias contra o câncer de próstata pode ser considerada uma estratégia promissora que garante ainda avaliação *in vivo* (RUSSO et. al., 2012).

Em ensaios utilizando seis bactérias *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, e *Klebsiella pneumoniae* foram extraídos os compostos como atranorina, ácidos girofórico e úsnico das espécies *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Parmelia caperata* (L.) Ach., *Physcia aipolia* (Ehrh.) Hampe e *Umbilicaria polyphylla* (L.) Baumg., esses compostos demonstraram atividade antibacteriana mais efetiva quando comparado a droga padrão com a estreptomicina (RANKOVIC'; MISIC'; SUKDOLAK, 2008).

## 1.2 ÁCIDO ÚSNICO

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9 $\alpha$ / $\beta$ H)-dibenzofurandiona;  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ ], (Figura 5) é um composto de origem natural resultante do metabolismo secundário de líquens (MÜLLER, 2001, COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002). Pode ser isolado de vários gêneros de líquens, tais como *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae) e *Parmelia* (Parmeliaceae) (INGLÓLFSDÓTTIR, 2002). Caracteriza-se por ser uma substância de pigmentação amarelada e de baixa solubilidade em água (10 mg/100 mL a 25 °C). Ocorre na natureza em duas formas enantioméricas (-) e (+) ácido úsnico (INGÓLFSDÓTTIR, 2002, COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002).

**Figura 5.** Estrutura química do ácido úsnico.

Fonte: (HONDA; VILEGAS, 1988).

O ácido úsnico é considerado um dos mais importantes metabólitos liquênicos biologicamente ativos, podendo representar mais de 5% do talo seco do líquen (MULLER, 2001).

A literatura descreve relevantes atividades biológicas para o ácido úsnico, tais como: antibiótica (COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002; ELO; MATIKAINEN; PELTTARI, 2007; SEGATORE et. al., 2012), antiinflamatória (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).

As primeiras avaliações sobre sua ação antibacteriana datam da década de 50. Inúmeras investigações têm ampliado o conhecimento desse metabólito liquênico como antibiótico (COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002). Elo; Matikainen; Pelttari, (2007), avaliaram a atividade do ácido úsnico frente a sete cepas de microrganismos resistentes, tais como, enterococo (vancomicina-resistente) e estafilococo (metecilina-resistente) clinicamente isolados onde foram utilizadas 12 concentrações do ácido úsnico que variaram de 0,0195 a 40 mg/mL, o qual foi verificado uma alta atividade frente a esses isolados, quando comparado com a ampicilina, droga de referência, mostrando o potencial valor clínico deste metabólito.

Estudos *in vitro* da atividade antimicrobiana do ácido úsnico foram avaliados em combinação com cinco antibióticos de referência (clindamicina, eritromicina, gentamicina, levofloxacina e oxacilina) disponíveis terapêuticamente. 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. Estes resultados confirmam a atividade antimicrobiana conhecida do ácido úsnico e sugere que o mesmo pode ser um bom candidato para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos ou combinações de medicamentos (SEGATORE et.al., 2012).

Vijayakumar et.al. (2000) estudaram a ação antiinflamatória do ácido úsnico em ratos Wistar com edema de pata e os resultados revelaram uma significativa redução do edema, utilizando uma dose de ácido úsnico de 100 mg/Kg de peso corpóreo, quando comparado com o ibuprofeno (na mesma dose), fármaco padrão de referência como antiinflamatório. No 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, respectivamente. Através desses resultados foi sugerido que o mecanismo de ação do ácido úsnico pode envolver uma inibição das prostaglandinas semelhante a outros fármacos antiinflamatórios.

Em estudos da atividade antitumoral do ácido úsnico frente ao tumor experimental sarcoma-180, observou-se que após administração do mesmo, em suspensão, na região intraperitoneal em camundongos Swiss obteve-se uma inibição do tumor de 43% (RIBEIRO-COSTA et al., 2006; SANTOS et al., 2006). Estes estudos também relatam redução na proliferação celular do carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2) demonstrando que a concentração requerida para inibir 50% da proliferação celular ( $CI_{50}$ ) foi de 12,6 e 14,4  $\mu\text{g/mL}$ , para o composto em suspensão e encapsulado em nanocápsulas, respectivamente.

Células de carcinoma de pulmão humano (NCI-H 292) foram utilizadas na investigação da ação antiproliferativa do ácido úsnico em suspensão e contido dentro das nanocápsulas poliméricas, os resultados desse trabalho exibiram uma atividade citotóxica  $CI_{50}$  de 10 e 13,8  $\mu\text{g/mL}$  para o composto em suspensão e encapsulado, respectivamente (SANTOS et. al., 2006).

Recentes estudos com o objetivo de investigar o efeito de seis metabólitos obtidos de seis espécies de líquens (ácidos difractáico, lobárico, úsnico, vicanicina, variolárico e protoliquesterínico) sobre a proliferação, viabilidade e espécies reativas de oxigênio (ROS), para três diferentes linhagens de células humanas de câncer, MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HeLa (adenocarcinoma colo do útero) e HCT -116 (carcinoma do cólon). Neste estudo comparativo, os metabólitos liquênicos mostraram vários efeitos citotóxicos de uma forma dependente da concentração, onde o ácido úsnico foi o agente citotóxico mais potente

com a menor concentração, enquanto que o ácido variolárico não inibiu a proliferação de qualquer uma das três linhas celulares utilizadas (BRISDELLI et. al., 2013).

A atividade antiviral de ácido úsnico e seus derivados foram analisados contra o vírus da pandemia de gripe A (H1N1). Um total de 26 compostos que representaram os isômeros (+) e (-) do ácido úsnico e seus derivados foram testados para a citotoxicidade e a atividade antiviral. Onze derivados do ácido úsnico apresentaram atividade antiviral e o isômero (-) do ácido úsnico foi mais ativo em comparação com isômero (+) (SOKOLOV, et. al., 2012).

O potencial antioxidante do ácido úsnico extraído de *Xanthoparmelia farinosa* (Vainio) foi avaliado utilizando linfócitos humano sob-radiação UVB. Comparando o ácido úsnico com o grupo controle as células incubadas mostraram uma sobrevivência superior e mantiveram suas atividades metabólicas no padrão da normalidade (KOHLHARDT-FLOEHR et. al., 2010). Esta atividade antioxidante foi confirmada por Behera; Mahadik; Morey, 2012 utilizando *Usnea complanata* que exibiu ação antioxidante e cardioprotetora através da eliminação de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica.

Em ensaios de cicatrização de feridas o ácido úsnico estimulou o fechamento das monocamadas de queratinócitos apresentado atividade bacteriostática e antioxidante na região lesionada, mostrando sua possível utilização em preparações na promoção da cura ou anti-envelhecimento (BRUNO et.al., 2013).

Atividade moluscicida foi relatada por Martins, 2013 onde foi avaliado o usnato de potássio sintetizado a partir do ácido úsnico, purificado de *Cladonia substellata*, em *Biomphalaria glabrata* e seus embriões. Foi observado que o usnato de potássio é eficaz contra os embriões dos caracóis, matando 100% deles a uma concentração de 10 ppm, enquanto que com 5 ppm apenas 51% estavam vivos. Além disso, a substância foi também muito ativa contra os indivíduos adulto da *B. glabrata*, matando 100% dos moluscos adultos a uma concentração de 1 ppm.

Nos Estados Unidos, foi relatado que o ácido úsnico, um dos princípios ativos do suplemento Lipokinetix<sup>®</sup> causou dano hepatocelular em indivíduos que consumiram este suplemento que continha usnato de sódio (FRAVEAU et.al., 2002). Dados afirmam que estas pessoas apresentaram falência aguda do fígado (NEFF et al., 2004). 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 são 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).

Estudos *in vitro*, demonstraram que hepatócitos isolados de ratos tratados com diferentes concentrações de ácido úsnico (5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ) 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).

O mecanismo de ação do ácido úsnico não está completamente elucidado, porém 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 conseqüentemente morte celular.

Devido aos escassos relatos sobre a toxicidade do ácido úsnico faz se necessário à continuidade das pesquisas para elucidar seu potencial tóxico sobre o organismo.

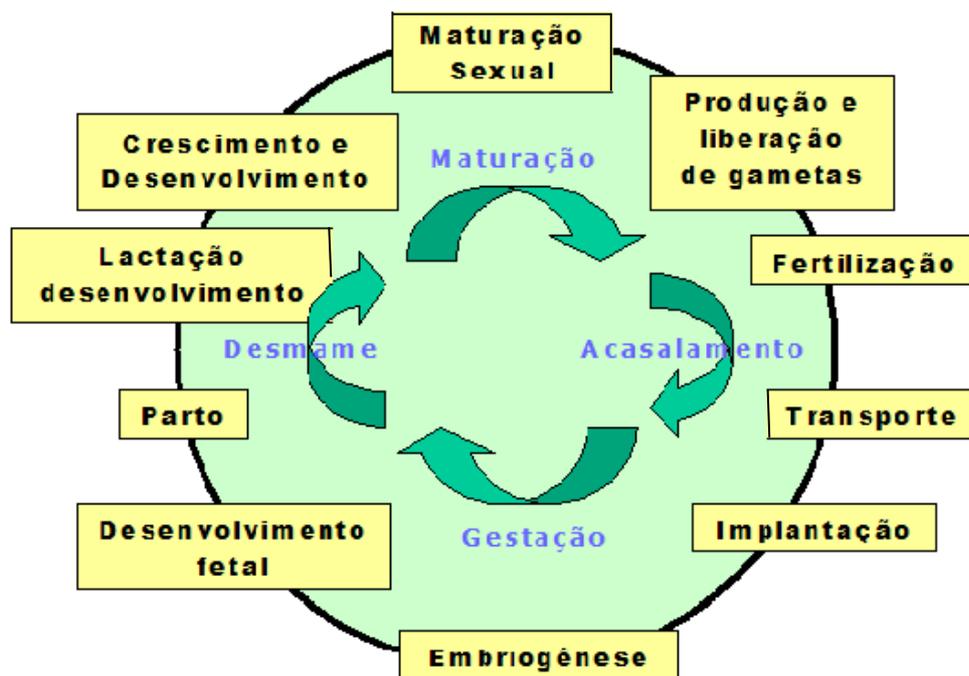
### **1.3 AVALIAÇÃO DA TOXICOLOGIA REPRODUTIVA**

O estudo avaliativo da toxicologia reprodutiva visa esclarecer os efeitos adversos produzidos pela exposição de fármacos, sejam elas naturais ou sintéticas, no organismo a se desenvolver. Nos estudos pré-clínicos da toxicidade reprodutiva, os ensaios realizados em animais, são avaliados 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).

Segundo a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição. Desta forma, faz-se necessário conhecer as condições de uso seguro dessas substâncias para a saúde. A toxicidade de uma substância a um ser vivo pode ser considerada como a capacidade de causar dano grave ou morte (BARROS; DAVINO, 2008).

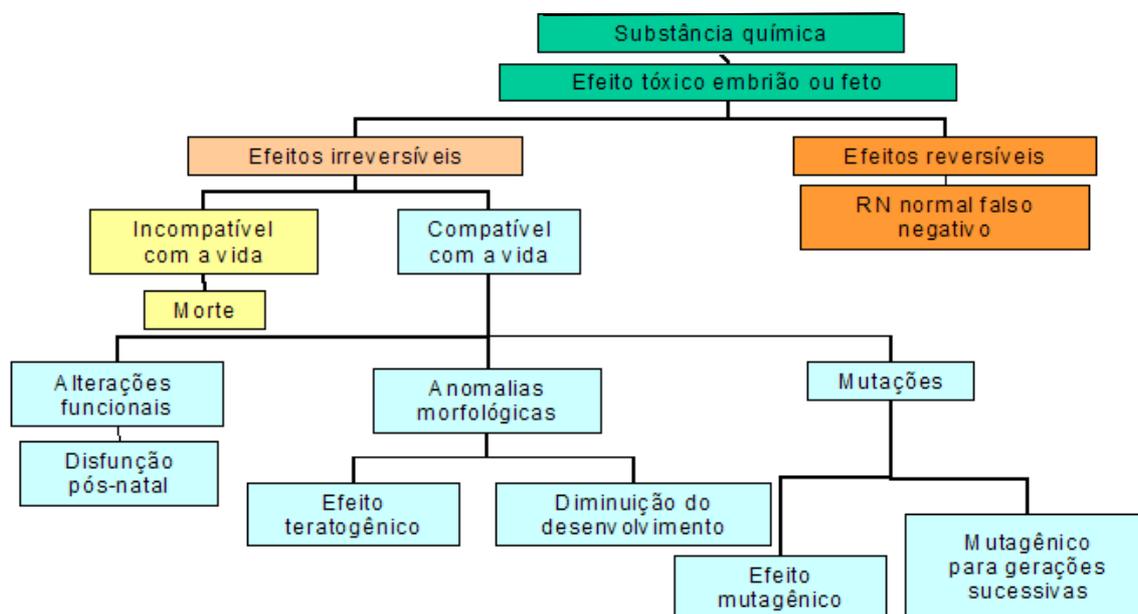
A reprodução em mamíferos é um processo complicado, prolongado e que envolve etapas dependentes a serem concluídas (Figura 6) tornando o organismo em desenvolvimento susceptível a interferência ambiental ou a de agentes químicos (LEMONICA, et. al., 2008; BORTOLINI, 2009).

**Figura 6.** Fase da reprodução dos mamíferos.



Fonte: (LEMONICA et. al., 2008).

Por ser um processo cíclico, a reprodução se divide em etapas: pré e pós-natal, amadurecimento sexual e acasalamento. A exposição de agentes químicos em cada fase pode gerar diversas alterações onde o organismo pode não concluir o desenvolvimento levando a morte, malformações externas e até mutações expressas em gerações sucessivas (Figura 7) (BORTOLINI, 2009).

**Figura 7.** Efeitos da exposição materna a compostos químicos durante a gestação.

Fonte : (LEMONICA et. al., 2008).

Esses efeitos adversos sobre a organogênese, período que se dá a formação dos órgãos pode ocasionar anormalidades no organismo em desenvolvimento (BERNARDI, 2003). A teratologia estuda anomalias e malformações que são provocados por perturbações durante o desenvolvimento embrionário e/ou fetal. Esses defeitos podem ser deformidades, displasias ou malformações (HANSEN; YANKOWITZ, 2002). Malformação não está limitada a 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 (BERNARDI, 2003).

Teratogenicidade é a indução exógena de anormalidades de desenvolvimento estrutural ocorrida durante a fase da organogênese (BERNARDI, 2003). Os estudos de teratogenicidade são realizados utilizando modelos animais e fornecem base para a verificação do potencial teratogênico de um determinado agente, sendo de grande importância para a compreensão dos princípios e mecanismos da teratogênese (BORGES, 2003). Com isso a compreensão do comportamento de uma determinada droga em um sistema biológico sempre é um assunto de primordial importância na análise toxicológica. Esta compreensão contribui imensamente para aperfeiçoar regimes de dosagens, potencialização da eficácia terapêutica. Assim sendo, torna-se necessário um estudo da ação tóxica sobre modelos animais, em especial, a ação dos efeitos de compostos naturais biologicamente ativos (BARROS; DAVINO, 2008).

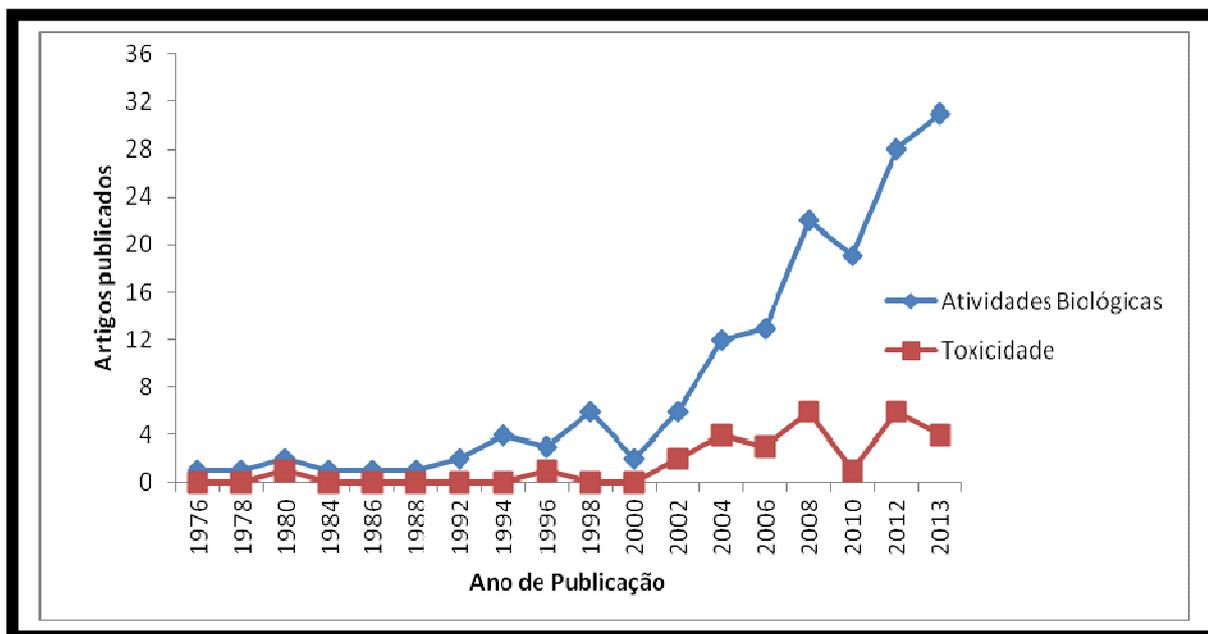
As utilizações de compostos naturais têm sido descritas por praticamente todos os povos. O conhecimento popular dos fitoterápicos tem sido amplamente utilizado a fim de solucionar um mal estar ou a cura de uma enfermidade. Devido esse aumento na procura do que é natural, visto que para a população esse conceito significa ausência de produtos químicos, a comunidade científica tem alertado para a utilização dos mesmos. Muitas plantas contem substâncias que são formadas para a manutenção da espécie evitando assim o ataque por predadores, algumas plantas populares com frequência estão associadas a casos de intoxicação, como exemplo, coroa-de-cristo, comigo-ninguém-pode, mamona e pinhão de purga (MENGUE, MENTEZ, SCHENKEL, 2001).

Rodrigues et. al. (2011) fizeram um levantamento das principais plantas medicinais que tenham efeitos embriotóxicos, teratogênicos e abortivos comprovados na literatura, em seus resultados, plantas que são popularmente utilizadas como antioxidantes, anti-sépticas, antifúngicas, antibacterianas e problemas digestivos; como arnica (*Arnica montana*), artemísia (*Artemisia vulgaris*), arruda (*Ruta chalepensis*), barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*), boldo (*Vernonia condensata*) podem gerar um desses efeitos. Verificou-se que para a maioria das plantas medicinais não há dados a respeito da segurança de seu uso durante a gravidez, e os mesmos são escassos e muitas vezes contraditórios. Revelando a necessidade de estudos voltados da interação fármaco/paciente de plantas medicinais sobre a gravidez.

Os líquens são utilizados desde a antiguidade quando um fragmento de líquen identificado como *Evenia furfuracea* foi encontrado em um vaso entre os anos de 1700 a 1600 a. C e com o tempo foram desenvolvidos estudos demonstrando diversas propriedades farmacológicas muitas vezes mais eficazes que fármacos de referência. Devido às diversas propriedades farmacológicas que as substâncias líquênicas possuem, aumentou o número de pesquisas científicas realizadas para demonstrar seu potencial biológico (MARTINS, 2013).

Dados do banco de pesquisa científica internacional, Scopus, utilizando as palavras chaves atividade biológicas do ácido úsnico e toxicidade do ácido úsnico revelam que estudos relacionados a atividades biológicas do ácido úsnico aumentaram, quando comparado às pesquisas científicas relacionadas à toxicidade, entretanto as publicações de artigos científicos não acompanharam o ritmo de pesquisas como a de atividades biológicas (Figura 8), com isso não elucidando o potencial tóxico que esse produto pode desenvolver no organismo. Em nenhum desses artigos revelaram o seu potencial tóxico em gestantes que é um dos requisitos para teste pré-clínicos na utilização de moléculas bioativas (ANVISA, 2010).

Figura 8. Pesquisas científicas sobre atividades biológicas e toxicidade do ácido úsnico.



Silva, 2013. Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com))

No Brasil, foi publicado em março/2010 o “Guia para a Condução de Estudos Pré-clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos”, elaborado pela Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, que é uma unidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esse documento orienta os estudos pré-clínicos de segurança para o desenvolvimento de novos medicamentos, é 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 (EMA), Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH), Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico. (OECD), Instituto Nacional do Câncer (NCI), Organização Mundial de Saúde (WHO), visando a uma padronização com a regulamentação internacional (ANVISA, 2010).

Com a publicação deste guia é impedido nas pesquisas científicas duplicidades de experimentos evitando assim a utilização desnecessária de animais sem que isso possa comprometer a obtenção e a confiabilidade das informações referentes ao novo composto em estudo. Neste Guia são encontrados os tipos de estudos identificados como obrigatórios para novas substâncias a serem testadas, são os eles: Estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas (crônica), toxicidade reprodutiva (fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial, de desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna, de

desenvolvimento embrio-fetal); genotoxicidade; tolerância local; carcinogenicidade e estudos de interesse para avaliação de segurança farmacológica (ANVISA, 2010).

Tendo a premissa que compostos naturais são isentos de reações adversas e efeitos tóxicos sobre o organismo em desenvolvimento, este estudo tem por objetivo investigar o potencial toxicológico do ácido úsnico em uma fase do período reprodutivo, organogênese, a fim de elucidar possíveis situações em que pode ocasionar potenciais riscos para a reprodução humana de ordem maior, menor ou igual a aquelas visualizadas em modelos experimentais.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

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

BORGES N. B. E. S. Desenvolvimento embrionário no microambiente tubário de ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) tratadas com *Hypericum perforatum* Linnaeus, 1753 [dissertação]. Juiz de Fora: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2003.

BORTOLINI, C. E. Efeito da administração de fitoterápico contendo *Glycine max* (L.) Merr durante o período da organogênese em ratas Wistar. [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

BRANQUINHO C.; MATOS P.; VIEIRA A. R.; RAMOS M. M. P. The relative impact of lichen symbiotic partners to repeated copper uptake. **Environmental and Experimental Botany**. v. 72, p. 84–92, 2011.

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. <http://portal.anvisa.gov.br/> acesso 10.12.2013.

BRISDELLI F.; PERILLI M.; SELITRI 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**. Article In Press, 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. Improved conditions and new data for the indication of lichen products by standardized thin layer-chromatographic method. **Journal of Chromatography**. v. 72, p. 1113-1125, 1972.

ELO H.; MATIKAINEN J.; PELTTARI E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Naturwissenschaften**. ed.94, p.465–468, 2007.

FRAVEAU U.J.; RYU T; BRAUNSTEIN M. L. G.; ORSHANSKY G.; PARK S. S.; CPPDY G. L.; LOVE L. A.; FONG T. L., Severe hepatotoxicity associated with the dietary supplement 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.

HONDA N. K.; VILEGAS W. **A química dos líquens**. São Paulo, v. 22, n. 1, 1988.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Molecules of Interest Usnic Acid. **Phytochemistry**. v. 61, p. 729-736, 2002.

IVANOVA D.; D. IVANOV. Ethnobotanical use of Lichens: Lichens for Food Review. **Scripta Scientifica Medica**. v. 41, p. 11-16, 2009.

KOHLHARDT-FLOEHR C.; BOEHM F.; TROPPE 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.

MARTINS M.C.B. Aplicações Biotecnológicas de Compostos Obtidos dos Líquens. [Tese]. Recife: Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

MELO M. G. D.; SANTOS J. P. A.; SERAFINI M. R.; CAREGNATO F. F.; PASQUALI M. A. B.; RABELO T. K., ROCHA R. F.; JUNIOR L. Q.; ARAÚJO A. A. S., SILVA F. A.; MOREIRA J. C. F.; GELAIN D. P. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. **Toxicology in Vitro**. v. 25, p.462–468, 2011.

MENGUE S. S.; MENTEZ L. A.; SCHENKEL E. P. Uso de Plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.11, p. 21-35, 2001.

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.

NICOLARDI V.; CAI G.; PARROTTA L.; PUGLIA M.; BIANCHI L.; BINI L.; GAGGI C. The adaptive response of lichens to mercury exposure involves changes in the photosynthetic machinery. **Environmental Pollution**. v. 160, p. 1-10, 2012.

PODTEROB P. Chemical Composition of Lichens and their Medical Applications. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 42, p. 32-38, 2008.

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.

RANKOVIC´ B.; MISIC M.; SUKDOLAK S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes* **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 24, p. 1239–1242, 2008.

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.

RODRIGUES, H.G.; MEIRELES, C.G.; LIMA, J.T.S.; TOLEDO, G.P.; CARDOSO, J.L.; GOMES, S.L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.13, n.3, p.359-366, 2011.

RUSSO A.; CAGGIA S.; PIOVANO M.; GARBARINO J.; CARDILE V. Effect of vicanicin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: Role of Hsp70 protein. **Chemico-Biological Interactions**. v.195, p.1–10, 2012.

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

SANTOS, N. P. S.; NASCIMENTO, S. C.; WANDERLEY, M. S.; PONTES-FILHO, N. T.; SILVA, J. F.; CASTRO, C. M.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanoencapsulation of usnic acid: na attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 64, p. 154-160, 2006.

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  $\Delta E$  model methods. **Phytomedicine**. v.19, p.341-347, 2012.

SHAHI S. K.; SHAHI M. P.; UPRETI D.K. Utilization of Lichen Metabolites as Natural Antifungal Drug against Dermatophytosis. **Journal of Pharmaceutical Research and Opinion**. v.1 p. 34-36, 2011.

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-inflamatory activity of (+) –unisc acid. **Fitoterapia**. v. 71, p 564-566, 2000.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Investigar o potencial toxicológico do ácido úsnico purificado e isolado de *Cladonia substellata* (ATHI) em ratas Wistar durante o período da organogênese.

#### **3.2. Específicos**

- Verificar o efeito do ácido úsnico purificado sobre a taxa de fertilidade e parâmetros fisiológico das fêmeas.
- Avaliar o efeito perinatal na prole (peso, viabilidade dos fetos, número de reabsorções totais do útero, malformações).
- Analisar alterações histológicas do fígado dos fetos tratados com ácido úsnico purificado.

#### 4. ARTIGO

**Efeito do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o desenvolvimento embrionário em fêmeas Wistar.**



**Artigo a ser submetido ao periódico Reproductive Sciences no formato original Research Article FI: 2.064; QUALIS CB II: B1 ).**

**Efeito do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o desenvolvimento embrionário em fêmeas Wistar.**

Silva, C. R.<sup>1</sup>; Silva, T. D. S.<sup>1</sup>; Martins, M. C. B.<sup>3</sup>; Santos, K. R. S.<sup>2</sup>; Aguiar-Junior, F. A.<sup>2</sup>; Pereira E. C.<sup>4</sup>; Santos, N. P. S.<sup>2</sup>; Silva, N. H.<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia, UFPE; PE, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, UFPE, PE, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, UFPE, PE, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Geografia Ambiental, Departamento de Ciências Geográficas, UFPE, PE, Brasil.

\*Autor correspondente

Nicácio Henrique da Silva

Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

Avenida Professor Moraes Rego, s/n, B. Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-Pernambuco, Brasil. (55) 81 21268541, (55) 81 21268540 (Ramal: 219), e-mail: [nicacio\\_hsilva@hotmail.com](mailto:nicacio_hsilva@hotmail.com)

## RESUMO

Este estudo tem por objetivo avaliar a toxicidade do ácido úsnico purificado em ratas durante a organogênese. Com a confirmação da gestação, as fêmeas foram distribuídas nos grupos controle, tratados I e II (doses de 15 e 25mg/kg). Ao 20º dia as fêmeas foram sacrificadas e seus fetos foram retirados e analisados. Foi observado uma redução no ganho de peso durante a gestação quando comparado ao grupo controle. Ocorreu um aumento de reabsorções, como também uma redução no número de fetos viáveis e no seu peso corporal. Na prole foram visualizadas alterações morfológicas como exposição do globo ocular e atrofia dos membros. Na análise histológica do fígado dos fetos foi observado uma redução no número de megacariócitos entre os grupos experimentais e um aumento no número de hepatócitos na dose de 25mg/kg. Estes estudos revelam a importância de se avaliar os efeitos tóxicos de substâncias para elucidar os cuidados na sua utilização ou indicação com potencial fármaco.

Palavras-chaves: Ácido Úsnico, Organogênese, Toxicidade Reprodutiva.

## ABSTRACT

This study aims to evaluate the toxicity of purified usnic acid in rats during organogenesis. With the confirmation of pregnancy, females were distributed in the control groups, treated I and II (doses of 15 and 25mg/kg). In the day 20<sup>th</sup> the female rats were sacrificed and their fetuses were removed and analyzed. A reduction in weight gain during pregnancy was observed when compared to control group. Occurred increased resorption, as well as a reduction in the number of viable fetuses and their body weight. Morphological changes in the progeny were visualized as exposure of the eye and atrophy of the limbs. Histological examination of the liver of the fetus a reduction in the number of megakaryocytes between experimental groups and one increase the number of hepatocytes in a dose of 25mg/kg was observed. These studies demonstrate the importance of evaluating the toxic effects of substances to elucidate the care in its use or potential drug indication.

Keywords: Organogenesis, Reproductive Toxicity, Usnic Acid.

## INTRODUÇÃO

O ácido úsnico apresenta diversas propriedades farmacológicas como antitumoral<sup>1</sup>, antibiótica<sup>2</sup>, antiviral<sup>3</sup>, antioxidante<sup>4</sup>, devido a essas propriedades aumentaram o número de pesquisas científicas realizadas para demonstrar sua eficácia.

Dados do banco de pesquisa científica internacional - Scopus - revelam que estudos sobre atividades biológicas do ácido úsnico em 1976 passou de 1 artigo para 31 artigos no ano de 2013. Quando comparado às pesquisas científicas relacionadas à toxicidade as publicações foram de 1 artigo em 1980 para 4 artigos publicados em 2013, mostrando que não acompanhou o ritmo de pesquisas em relação a de atividades biológicas (Figura 1).

Um “Guia para a Condução de Estudos Pré-clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos”, foi elaborado pela Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF é uma unidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nesse documento orienta os estudos pré-clínicos de segurança para o desenvolvimento de novos medicamentos, o mesmo é fundamentado em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos dos Estados Unidos: FDA e da Europa: EMEA, ICH, OECD, NCI, WHO, visando a uma padronização com a regulamentação internacional<sup>5</sup>.

Neste Guia são encontrados os tipos de estudos identificados como obrigatórios para novas substâncias a serem testadas, são eles: Estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas (crônica), toxicidade reprodutiva (fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial, de desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna e de desenvolvimento embrio-fetal); genotoxicidade; tolerância local; carcinogenicidade e estudos de interesse para avaliação de segurança farmacológica<sup>5</sup>.

O escasso desenvolvimento de estudos toxicológicos de produtos liquênicos, como o ácido úsnico e sua ampla descoberta de atividades biológicas promove a necessidade de estudos pré-clínicos, entre eles ensaios sobre o ciclo reprodutivo, para o desenvolvimento de novos medicamentos.

A utilização de modelo experimental em animais determina assim situações em que pode ocasionar potenciais riscos para a reprodução humana de ordem maior, menor ou igual àquelas visualizadas em modelos experimentais, permitindo o aperfeiçoamento das dosagens e potencialização da eficácia terapêutica, reduzindo os danos ao organismo em estudo.

Este estudo visa avaliar a toxicidade do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* em ratas Wistar durante o período da organogênese<sup>6</sup>.

## METODOLOGIA

### Material liquênico

O líquen *Cladonia substellata* (AHTI) foi coletado no Município de Mamanguape, Estado de Paraíba, Nordeste do Brasil. O ácido úsnico, substância principal, foi isolado, purificado e caracterizado quimicamente conforme metodologia pré-estabelecida no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica, UFPE<sup>7</sup>.

### Animais experimentais

Foram utilizados 27 ratos Wistar, sendo 18 fêmeas e 9 machos fornecidos pelo biotério do Departamento de Nutrição UFPE, pesando cerca de 300g e com 60 dias de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas enfileiradas com ambiente climatizado em fotoperíodo (12 horas claro 12 horas escuro) a uma temperatura controlada de 25 °C ± 2 °C com exaustão de ar; a alimentação e água foram providas *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (processo n° 23076.029828/2013-94).

### Procedimento experimental

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 através da técnica de estirasso foram preparadas lâminas que posteriormente foram coradas com SHORR. Através de análises microscópicas (Olympus BH-2, Japan) 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) *overnight* e, o acasalamento foi confirmado com a presença do “*plug*” (massa esbranquiçada de espermatozóides na abertura vaginal) ou 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.

As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente nos grupos controle (n=6), tratado I (n=6) e tratado II (n=6). As fêmeas do grupo controle receberam 1,0 mL de solução fisiológica, enquanto as do grupo tratado I e II receberam o ácido úsnico purificado na dose de 15 mg/kg e 25 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Dose calculada com base no estudo da DL<sub>50</sub> (Dose Letal que mata 50% dos animais)<sup>8</sup> e que são utilizadas em ensaios de atividade biológicas<sup>9</sup>. As doses do ácido úsnico purificado foram dissolvidas em 10 mL de tampão PBS e 0,1 mL de Tween 80, produtos MERCK®, administrado via oral (gavagem), durante o 6° ao 15° dia de gestação, dose diária.

Durante a administração as fêmeas foram pesadas para avaliar o ganho de massa corporal no 6º, 10º, 14º e 20º dia de gestação. Após esse período as fêmeas foram sacrificadas 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<sup>10</sup>. Em seguida, os fetos e suas placentas foram pesados.

Para registro de anomalias viscerais na prole foi avaliado o fígado de cada ninhada. Após o sacrifício os fígados foram dissecados 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).

Para a análise histomorfométrica do fígado da prole, as imagens histológicas das lâminas foram capturadas por câmera digital (Moticam 3.0) acoplada ao microscópio óptico (Olympus BH-2, Japan), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 30 campos por lâmina com aumento final de 400X. As fotomicrografias foram avaliadas através do software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.), onde em cada uma das amostras histológicas do fígado foram avaliados o número de hepatócitos e megacariócito por campo, determinando a partir destes, a média do número das células analisadas por cada fígado dissecado. A partir dos valores obtidos foram produzidos os gráficos, esses dados foram normalizados para o controle, sendo o controle igual a 100%.

Os sítios de implantação foram identificados pelo Lugol, nos úteros livres de seu conteúdo os sítios de implantação foram visualizados através do contraste com o tecido uterino. As implantações apareceram como pontos claros que foram localizadas e contabilizadas. O número de reabsorções foi o resultado do número de sítios de implantação menos o número de fetos.

### **Análise Estatística**

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

## RESULTADOS

Durante o período de tratamento por gavagem, nas fêmeas na organogênese fetal, o ácido úsnico purificado nas doses de 15 mg/kg e 25 mg/kg não foi observado sinais clínicos fisiológicos de toxicidade ou alteração comportamental como perda de pelos, hipoatividade ou vocalização; entre os grupos experimentais. Nenhuma morte foi registrada no decurso do tratamento e após a fertilização em ambos grupos todas as fêmeas levaram a prenhez a termo.

No ganho de peso materno durante a gestação, os dados revelaram que o grupo de ratas tratadas com o ácido úsnico purificado nas doses de 15 mg/kg e 25 mg/kg, apresentaram uma redução significativa no ganho de peso corpóreo quando comparado ao grupo controle nos dias 10<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> de gestação (Tabela 1).

Os resultados obtidos a partir das variáveis reprodutivas consideradas indicaram que o tratamento com o ácido úsnico purificado durante o período da organogênese produziu alterações entre os grupos analisados. Essas alterações como o número de fetos e reabsorções, peso do feto e do fígado foram mais significativas na dose 25 mg/kg de peso corporal.

Analisando os parâmetros dos fetos provenientes das fêmeas tratadas com ácido úsnico purificado observou-se uma redução significativa no peso médio quando comparado ao controle. As que receberam o tratamento na dose de 15 mg/kg visualizou-se uma redução de 19,2% enquanto que os tratados com a dose de 25 mg/kg observou-se uma redução de 38,5% no peso corporal médio dos fetos obtidos. Foi visualizado uma redução significativa no número de fetos viáveis das fêmeas tratadas onde foi observando uma média de  $(10 \pm 1)$  de fetos viáveis quando foi administrada a dose de 15 mg/kg e  $(8 \pm 1,4)$  para a dose de 25 mg/kg quando comparado ao controle  $(12 \pm 1)$ . No peso médio dos fígados de fetos das fêmeas tratadas com ácido úsnico a 15 mg/kg foi evidenciado uma leve redução  $(0,34 \pm 0,02g)$  quando comparado ao grupo controle  $(0,5 \pm 0,02g)$ . Por outro lado uma relevante diminuição  $(0,2 \pm 0,05g)$  foi observado no grupo de fêmeas tratadas na dose de 25 mg/kg. (Tabela 2).

Quanto a morfologia externa no grupo controle foi observado que o número de fetos apresentava-se dentro da normalidade (Figura 2A). Enquanto no grupo tratado com 25 mg/kg, podemos observar que além da interrupção no seu desenvolvimento, tornando os mesmos inviáveis (Figura 2B), houve uma redução significativa em seu número (Figura 2C). Para a dose de 15 mg/kg o número de fetos não viáveis foi evidenciado uma redução média  $(2 \pm 0,8)$  por fêmea em comparação ao grupo controle (0), mostrando uma diminuição na toxicidade do composto em estudo, pois para a dose de 25mg/kg observou-se uma média de  $(4,3 \pm 0,8)$  fetos não viáveis por fêmea.

Não foram observadas mudanças na coloração da placenta, dos grupos experimentais, conseqüentemente, nenhuma alteração na circulação sanguínea e trocas materno-fetais foram visualizadas. Observando a prole das ratas tratadas com ácido úsnico na dose de 25 mg/kg percebeu-se que alguns úteros apresentaram a presença de placenta diminuta (Figura 3A), com uma massa em desenvolvimento, esta seria o futuro feto (Figura 3B), porém esta malformação não foi evidenciada na dose de 15 mg/kg.

Dentre as malformações observadas nas ninhadas obtidas das fêmeas tratadas com ácido úsnico ocorreram uma protrusão do globo ocular (Figura 4A), intensa proliferação de uma massa celular localizada na região superior envolvendo a face, pescoço e o membro superior (Figura 4B) e também uma atrofia dos membros superiores e inferiores (Figura 4C). Na dose de 15 mg/kg não foram visualizadas alterações morfológicas externas. Nos grupos experimentais tratados com ácido úsnico houve um aumento significativo no número de reabsorções dos fetos quando comparado ao grupo controle ( $1,1 \pm 0,4$ ), para o tratamento com 15 mg/kg houve um aumento ( $3,5 \pm 0,5$ ), porém menos expressiva quando comparado ao tratamento de 25 mg/kg ( $5 \pm 1$ ) (Tabela 2).

A análise microanatômica dos fígados dos fetos obtidos das fêmeas do grupo controle mostrou padrões de normalidade. Nos lobos hepáticos foram visualizados cordões de células hepáticas anastomosadas aos capilares sinusóides (Figura 5A). Entretanto, os limites entre os lóbulos não estavam ainda bem definidos, como também não foi observada a organização típica das estruturas dos espaços porta. Não foi possível a observação das células de Ito nem de Kupffer, visto que os capilares sinusóides encontravam-se preenchidos de sangue, impedindo a visualização das mesmas. Foram observados ainda, entre os cordões hepáticos, megacariócitos (Figura 6A) e diversas células sanguíneas, principalmente da linhagem eritrocitária em diferentes estágios de desenvolvimento.

O fígado do grupo de fetos das fêmeas tratados com ácido úsnico na dose de 15mg/kg apresentou cordões de células hepáticas anastomosadas aos capilares sinusóides (Figura 5B), no entanto, não foi observada organização lobular. Os capilares sinusóides estavam totalmente preenchidos por sangue, impedindo também a visualização das células de Ito e de Kupffer. As estruturas dos espaços porta também não foram evidenciadas, foram observadas células da linhagem eritrocitária e leve redução não significativa na quantidade de megacariócitos (Figura 6B) entre os cordões hepáticos por campo analisado quando comparado ao grupo controle.

Para o fígado dos fetos tratados com ácido úsnico na dose de 25 mg/kg os cordões de hepatócitos (Figura 5C) mostravam-se significativamente em maior quantidade quando

comparado ao grupo controle e o tratado com 15 mg/kg, foi observado à presença de células sanguíneas em diferentes estágios de desenvolvimento. Em relação aos megacariócitos (Figura 6C) foi observado uma redução significativa por campo analisado, quando comparado ao grupo controle.

A histomorfometria do fígado da prole em relação ao número total de hepatócitos quando administrado a dose de 15mg/kg não mostrou alteração significativa ( $33,2 \pm 9,9$ ) na média de células quando comparado ao grupo controle que obteve a média de ( $33,4 \pm 8,6$ ) o que corresponde na normalização pelo controle que é de 100% um valor de 99,2% para dose 15 mg/kg. Para a dose de 25 mg/kg foi visualizado um aumento significativo no número médio de hepatócitos ( $41,6 \pm 6$ ) o que caracteriza 124,3% de aumento quando comparado ao controle (Figura 7).

Em relação à contagem megacariócito houve uma redução na média de células ( $0,12 \pm 0,01$ ) que representou 47,83% na dose de 15mg/kg quando comparado ao grupo controle ( $0,17 \pm 0,01$ ). Para a dose de 25 mg/kg apresentou uma redução expressiva na média das células ( $0,08 \pm 0,01$ ) que expressa pela normalização do grupo controle uma redução de 70,6% (Figura 8).

## DISCUSSÃO

Os estudos relacionados à toxicologia do desenvolvimento estão concentrados na fase pré-implantação<sup>11</sup>, no cultivo *in vitro* de embriões de ratos<sup>12</sup> e na maturação física e pós-natal de camundongos<sup>13</sup>, sendo pouco elucidado o estudo da ação tóxica no período da organogênese.

A avaliação de efeitos de um fármaco inclui pesquisas para analisar sua toxicidade sobre o organismo materno e sua prole. Sabe-se, portanto, que a toxicidade é caracterizada pela perda de peso corporal, acompanhada ou não de redução do consumo de alimentos, os pêlos eriçados, além de alterações de peso nos órgãos<sup>14</sup>. Essas alterações podem ser transitória ou permanente na fisiologia com um potencial para causar efeitos adversos na prole durante o desenvolvimento embrionário ou pós-natal que está intimamente associada a malformações características de cada espécie<sup>15</sup>.

De acordo com Louzada e colaboradores<sup>16</sup> indicam que os indícios de toxicidade materna estão relacionados à presença de perda de peso corporal, acompanhada ou não de redução do consumo de alimentos. Em nossos estudos foram visualizadas redução no ganho de peso corporal durante a gestação das fêmeas tratadas com o ácido úsnico em ambas as doses testadas o que sinaliza indício de toxicidade do composto em estudo.

Esses dados são confirmados em estudos de toxicidade reprodutiva com a Beta-lapachona que também possui propriedades antioxidativa como o ácido úsnico. Em seus resultados demonstraram que em doses 40 mg/kg, 60 mg/kg e 160 mg/kg aplicados durante o período da organogênese exibiu uma diminuição no ganho peso corporal das fêmeas durante a gestação, malformações esqueléticas e diminuição dos fetos viáveis<sup>17</sup>.

As proles dos grupos tratados apresentaram uma redução expressiva no peso corporal em relação ao grupo controle, enquanto a faixa de normalidade peso corporal fetal ao nascer é entorno de 6 gramas<sup>18</sup>. Os fetos das fêmeas tratadas com o ácido úsnico exibiram a média de 4,6g e 3,5g nas doses de 15 mg/kg e 25 mg/kg, respectivamente.

Em estudos toxicológicos no período da gestação com o extrato de *Acanthus montanus* (Nees) T.<sup>19</sup>, que possui atividades antiinflamatória como o ácido úsnico, em dose 500 mg/kg aplicado durante a organogênese demonstraram uma média de peso de 2.33g por ninhada. Esses dados de redução de peso fetal foram confirmados para substâncias puras em ensaios da toxicidade reprodutiva com o ácido acetilsalicílico (AAS)<sup>20</sup> sobre as fêmeas revelaram uma diminuição no número de crias vivas e também queda do ganho de peso materno, dos conceptos e placentas nas ratas tratadas com dose acima de 100 mg/kg, comparando assim que o ácido úsnico em doses menores as utilizadas nesses experimentos com extrato de *Acanthus montanus* (Nees) T. e substâncias puras como AAS exibiu toxicidade reprodutiva semelhante.

Na prole dos grupos tratados foi constatada uma redução no número de fetos viáveis por ninhada, ou seja, aqueles que prosseguiram o desenvolvimento após o nascimento. Para a normalidade reprodutiva o número de filhotes provenientes de ratas da linhagem Wistar em idade fértil é de 12 a 14 conceptos por ninhada<sup>21</sup>. Baseado nesta referência observou toxicidade reprodutiva do ácido úsnico visto que a média de feto por fêmea foi de 8 para a dose de 25 mg/kg. Embora utilizando uma dose reduzida de 15 mg/kg o composto em estudo este se mostrou tóxico, pois a média de fetos não atingiu o padrão de normalidade ficando com a média de 10 conceptos por ninhada.

Foi observado macroscopicamente interrupções no desenvolvimento dos fetos obtidos das ratas nos grupo tratado com 25 mg/kg onde apresentavam placenta diminuta com uma massa celular que seria o feto, esses resultados são encontrados na toxicidade reprodutiva de extratos de *Pfaffia glomerata* spreng (giseng brasileiro) raiz medicinal. Encontrada na região do Pantanal utilizada como fitoterápico pela população para solucionar problemas de visão, memória, contra stress, câncer e envelhecimento.

Quando administrado 1 mL do extrato da *Pfaffia glomerata* spreng (giseng brasileiro) via oral demonstrou um atraso no desenvolvimento fetal, a presença de uma placenta atrofiada além de malformações externas à prole de ratas prenhas do grupo controle<sup>22</sup>. Estes resultados se encontram de acordo com os descritos na literatura em ensaios da toxicidade reprodutiva de extratos de *Duguetia furfuraceae*<sup>23</sup>, onde foi descrito um aumento na reabsorção em forma de cistos nos ovários das ratas prenhas, evidenciando aborto.

Foram visualizados nos fetos que prosseguiram o desenvolvimento presença de malformações decorrentes das proles de fêmeas tratadas com ácido úsnico na dose de 25 mg/kg, tais como atrofia dos membros superiores e inferiores, saliência do globo ocular e presença de uma massa celular na região superior do animal o que sugere a ação teratogênica do ácido úsnico, pois promoveu a indução de anormalidades no desenvolvimento anatômico sendo estas incompatíveis com a vida como descrito no ensaio de toxicidade da *Duguetia furfuraceae*<sup>23</sup>.

Na análise histológica do fígado do grupo de fetos das fêmeas tratados com ácido úsnico na dose de 15 mg/kg foi observado uma redução, não significativa, na quantidade de megacariócitos comparado ao grupo controle, já para a dose de 25 mg/kg os megacariócitos apresentaram uma redução significativa por campo analisado, quando comparado ao grupo controle.

Sabe-se que a hematopoese hepática persiste do período neonatal inicial até o período fetal e começa a declinar nas primeiras semanas de vida<sup>24</sup>. Com os resultados obtidos a dose de 25mg/kg exibiu toxicidade alterando o processo de formação dessas células com isso podendo provocar uma deficiência na cascata da coagulação inicial do organismo, pois essas células polinucleadas originam as plaquetas sanguíneas. A dose de 15 mg/kg apresentou essa redução, porém não foi significativa mostrando uma redução da toxicidade.

A histomorfometria do fígado da prole em relação ao número total de hepatócitos quando administrado a dose de 15 mg/kg não mostrou alteração significativa na média de células quando comparado ao grupo controle, no entanto na dose de 25 mg/kg foi visualizado um aumento significativo no número médio de hepatócitos. As substâncias naturais e/ou sintéticas que atravessam a placenta penetram na circulação do feto através da via umbilical e passam pelo fígado do feto antes de atingir o coração e a circulação sistêmica<sup>25</sup>, a falta de estudos de toxicidade sobre o ciclo reprodutivo do ácido úsnico e sua biodistribuição após a ingestão nos impede de fazer comparações mais precisas.

Contudo, substâncias que já foram comprovadas a passagem pela barreira placentária como o etanol<sup>26,27</sup> demonstraram um atraso no desenvolvimento hepático normal, ou seja,

uma redução de hepatócitos, quando comparado com o grupo controle. No entanto, analisando o número de fetos de fêmeas tratadas com o etanol manteve-se dentro da normalidade, o que não foi observado em nossos estudos, no qual ocorreu uma diminuição de fetos por fêmea, estes dados podem representar uma adaptação ou uma reposta à toxicidade reproduzida pelo ácido úsnico durante o período da organogênese.

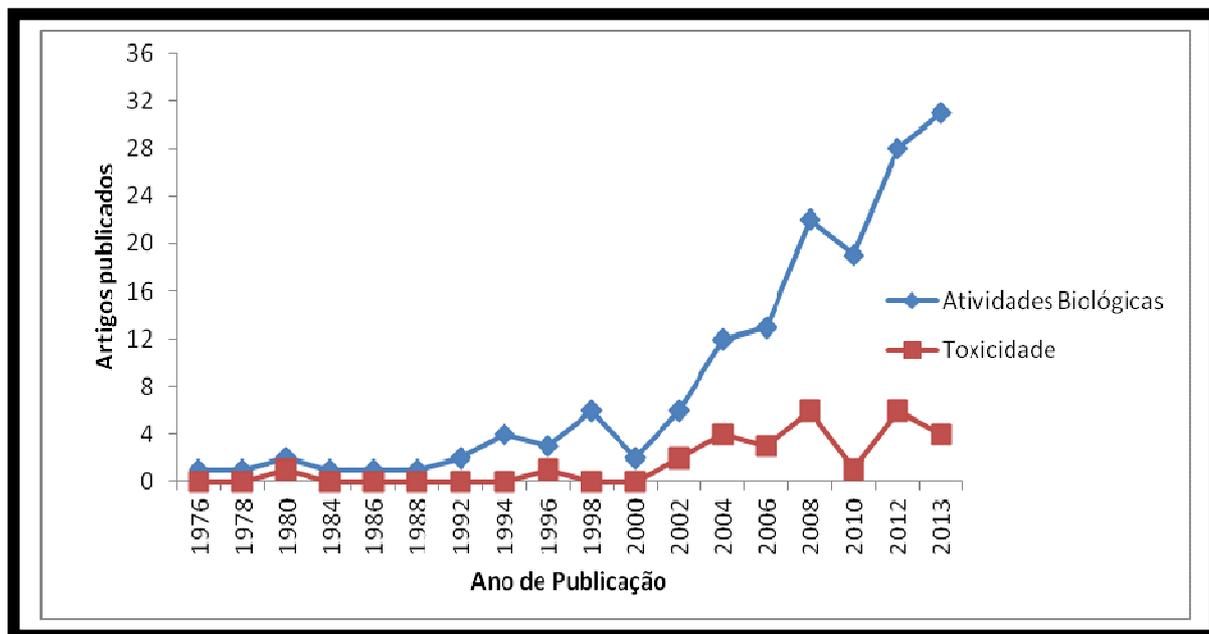
O modelo experimental utilizado no presente trabalho demonstrou que o ácido úsnico apresentou toxicidade no período da organogênese onde a dose mais tóxica foi a de 25 mg/kg. A dose de 15 mg/kg é uma dose candidata a novos estudos experimentais. Com isso revela-se a importância na avaliação dos efeitos tóxicos de substâncias naturais a fim de elucidar os cuidados na sua utilização ou indicação com potencial fármaco.

## REFERÊNCIAS

1. BRISDELLI F.; PERILLI M.; SELITRI 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.
2. SEGATOREA 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  $\Delta E$  model methods. **Phytomedicine**. v.19, p.341-347, 2012.
3. 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 (-) and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 22, p. 7060–7064, 2012.
4. 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
5. 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. <http://portal.anvisa.gov.br/> acesso 10.12.2013.
6. MÖLLER V. M.; DALLEGRAVE E.; COELHO R; PEREIRA J.; LANGELOH A. Efeitos da ivermectina (Ivomec® 1% injetável) administrada a ratas Wistar durante o período de organogênese. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 40, 2003.
7. ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of Lichen Substances**. Tokio: Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. 240p

8. VIRTANEN O.; KARKI N. On the toxicity of usnic acid preparation with the trade name usno. **Suomen Kehruistileliti**. v.29, p.225-226.
9. SANTOS, N. P. S.; NASCIMENTO, S. C.; WANDERLEY, M. S.; PONTES-FILHO, N. T.; SILVA, J. F.; CASTRO, C. M.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanoencapsulation of usnic acid: na attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 64, p. 154-160, 2006.
10. MANSON J. M; KANG Y. J. **Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology**. In: Hayes AW, editor. Principles and methods of toxicology. 3rd ed. New York: Raven Press;.1034p., 1994
11. BORGES N. B. E. S. Desenvolvimento embrionário no microambiente tubário de ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) tratadas com *Hypericum perforatum* Linnaeus, 1753 [dissertação]. Juiz de Fora: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2003.
12. CHAN L. Y.; CHIU P.; LAU T. A study of hypericin-induced teratogenicity during organogenesis using a whole rat embryo culture model. **Fertil Steril**. v. 76, p.10-18, 2001
13. RAYBURN W. F, GONZALEZ C. L, CHRISTENSEN H. D, HARKINS T. L, KUPIEC T. C. Impact of hypericum (St.-John's-wort) given prenatally on cognition of mice offspring. **Neurotoxicol Teratology**. v. 23, p.629-37, 2001.
14. YAO M.; RITCHIE H. E.; BROWN-WOODMAN P. D. A developmental toxicity-screening test of valerian. **Journal Ethnopharmacol**. v. 113, p.204-206, 2007.
15. KHERA K. S. Maternal toxicity of drugs and metabolic disorders: a possible etiologic factor in the intrauterine death and congenital malformations: a critique on human data. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 17, p.345-348, 1987.
16. LOUZADA A. F.; RAMOS H.; RODRIGUES J. K.; SILVA L. R.; Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com tacrolimus durante a fase de pré-implantação **Revista Brasileira Ginecologia Obstetrícia**. v.30, p 219-224, 2008.
17. ALMEIDA E. R; LUCENA F. R. S.; SILVA C. V. N. S.; COSTA-JUNIOR W. S.; CAVALCANTI J. B.; COUTO G. B. L.; SILVA L. L. S.; MOTA D. L.; SILVEIRA A. B.; FILHO S. D. S.; SILVA A. C. P. Toxicological Assessment of Beta-lapachone on organs from pregnant and non-pregnant rat. **Phytotherapy Research** ed. 23, p.1276-1280, 2009.
18. SHARPP E.; LAREGINA M. C. Experimental methodology: the laboratory rat. **Resbcial**. v.1, p 121-129, 2012.
19. NANAA P.; ASONGALEM E.A.; FOYET H.S.; FOLEFOC G.N.; DIMOA T.; KAMTCHOUING P. Maternal and developmental toxicity evaluation of *Acanthus montanus* leaves extract administered orally to Wistar pregnant rats during organogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**. ed.116 p.228–233, 2008.

20. ESPIRIDIÃO S.; AJEJE R.; KOPELMAN B. I.; SIMÕES M. J. Ação Crônica do Ácido Acetilsalicílico na Prenhez da Rata. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 20, nº 5, 1998.
21. KRINKE G.J. History, Strains and Models. In: Bullock GR, editor. **The laboratory rat**. San Diego: Academic Press, 2000. 316 p.
22. TOLEDO M. R. S.; SILVA C C. A.; ANTONELLO D.; . PIMENTA K.R.; VIEIRA M. C.; RAMOS M. B. M.; HEREDIA N. A. Z.; SCALON S. P. Q.; BAZZANO T. S. C. Extratos Aquosos de *Pfaffia glomerata Spreng* e seu efeito tóxico em ratas prenhez. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais Botucatu**. v. 9, p. 200-204, 2006
23. TOLEDO M. R S.; PERES M. T. L. P.; VIEIRA M. C.; BAZZANO, T. S. C.; TEIXEIRA, I. R. Fitotoxicidade do extrato aquoso *Duguetia furfuraceae (St. Hil) B* em ratas (*Rattus norvegicus*). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais. Botucatu**. v.8, p. 218-222, 2006.
24. SI-TAYEB K.; LEMAIGRE F. P.; DUNCAN S. A. Organogenesis and Development of the Liver. **Developmental Cell Review** ed. 18 p. 1-15, 2010.
25. BERNARDI M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Editora Guanabara Koogan, ed. 2, 574p., 2003.
26. 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.
27. 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.

**Figuras**

Silva, 2013

Fonte: Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com))

Figura 1. Pesquisas científicas sobre atividades biológicas e toxicidade do ácido úsnico.

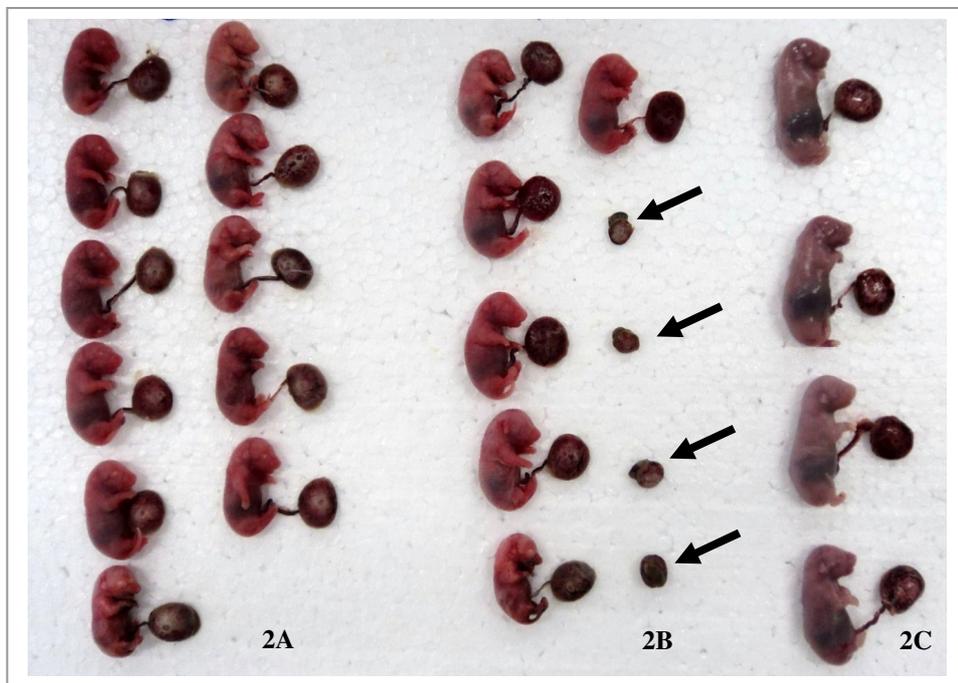


Figura 2. Fetos obtidos dos grupos experimentais 25 mg/kg: 2A= Grupo Controle 2B= Grupo Tratado dose 25 mg/kg setas mostrando embriões com interrupção no desenvolvimento 2C= Grupo Tratado 25 mg/kg apresentando redução no número de fetos viáveis.

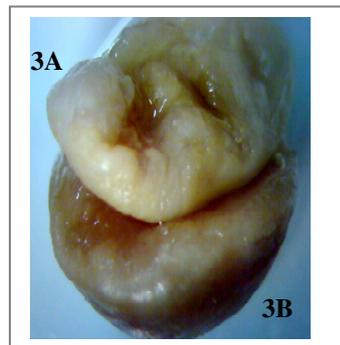


Figura 3. Feto obtido de fêmea tratada com ácido úsnico purificado na dose 25 mg/kg apresentando interrupção no desenvolvimento embrionário: 3A= Massa em desenvolvimento 3B= Placenta.

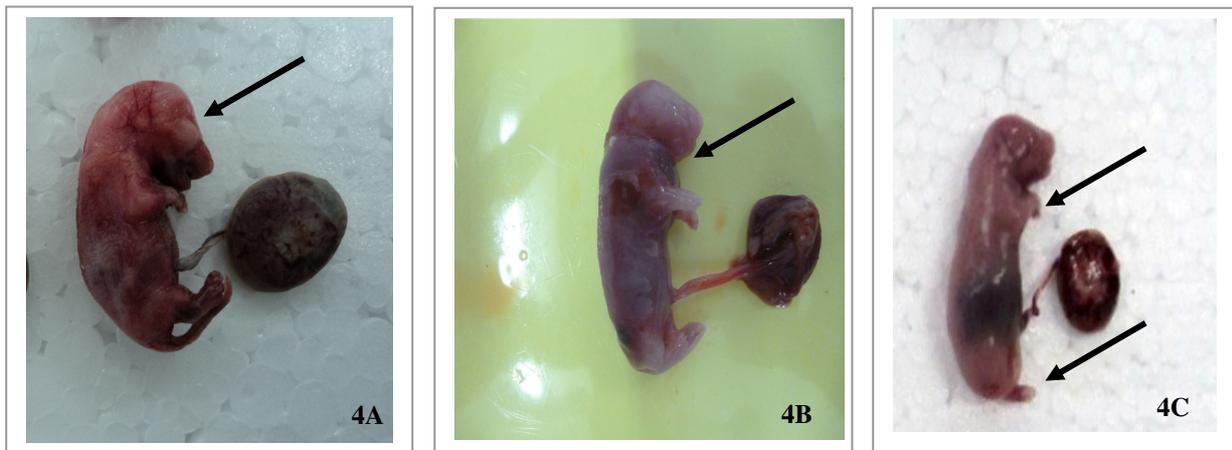


Figura 4. Malformações nos fetos obtidos de fêmeas tratadas com ácido úsnico purificado: 4A= Seta mostrando protrusão do globo ocular 4B= Seta mostrando massa celular na região superior do feto 4C= Setas mostrando atrofia dos membros superiores e inferiores.

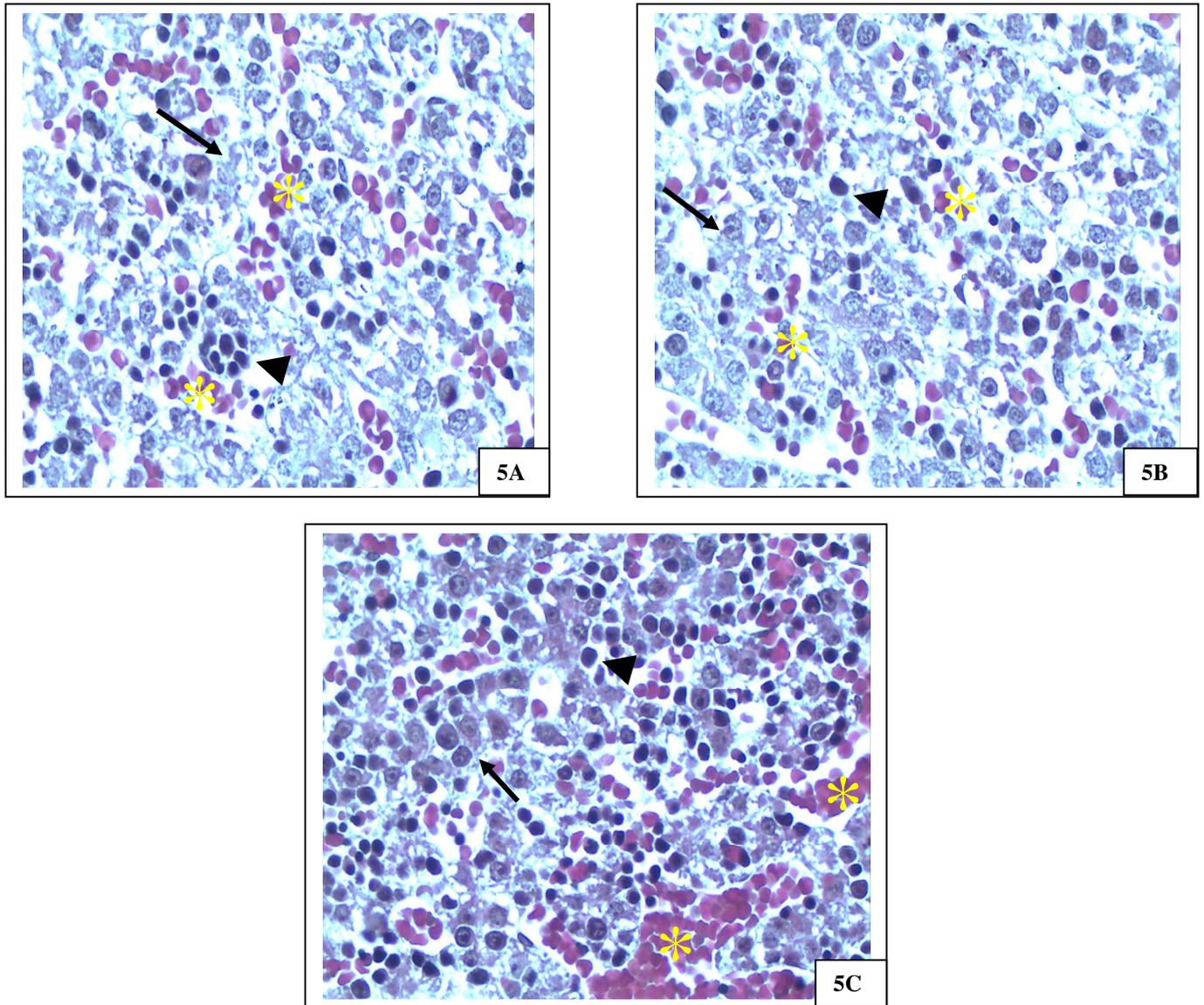


Figura 5. Fotomicrografia do fígado da prole dos grupos experimentais: Visualização dos cordões de hepatócitos (seta), os capilares sinusóides (asteriscos), células da linhagem eritrocitária (cabeça da seta). 5A= Grupo Controle 5B= Grupo Tratado 15 mg/kg com quantidade de hepatócitos semelhante ao Grupo Controle 5C= Grupo Tratado 25 mg/kg maior quantidade de hepatócitos quando comparado ao Grupo Controle e o Tratado com 15 mg/kg. Coloração Tricômico de Manson. Aumeto 400X.

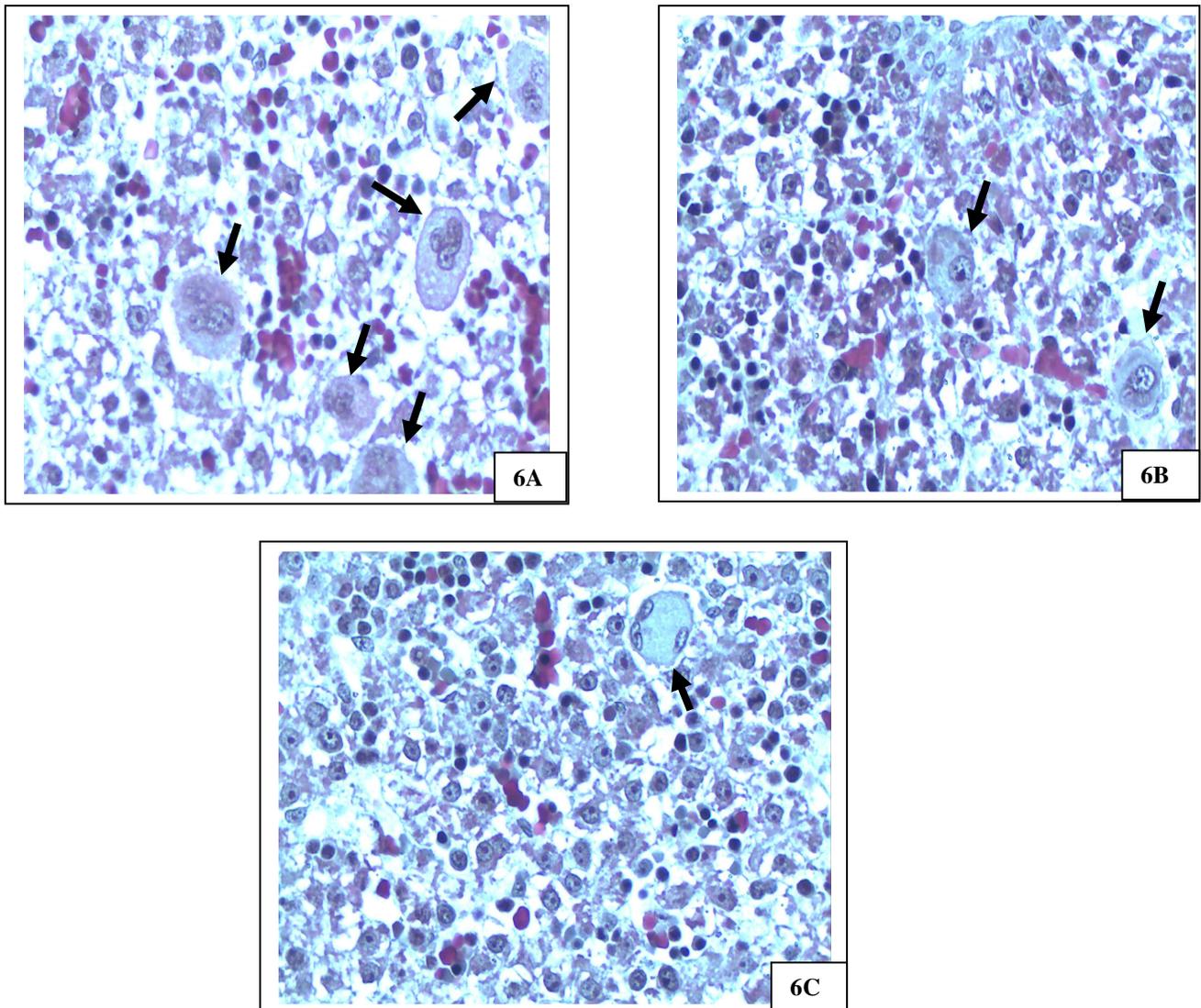


Figura 6. Fotomicrografia do fígado da prole dos grupos experimentais: Visualização dos megacariócito (seta). 6A= Grupo Controle 6B= Grupo Tratado 15 mg/kg redução, não significativa, na quantidade de megacariócito 6C= Grupo Tratado 25 mg/kg redução significativa na quantidade de megacariócito quando comparado ao grupo controle e 15 mg/kg, Coloração Tricômico de Manson. Aumeto 400X.

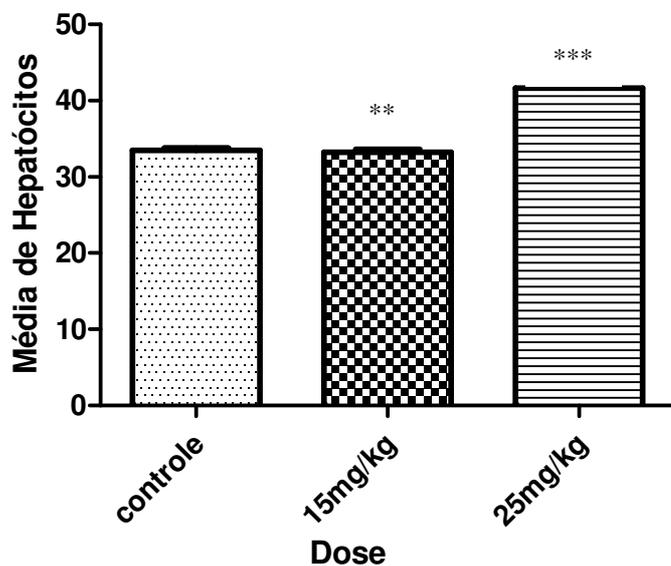


Figura 7. Análise da média dos hepatócitos nos grupos experimentais. Dados expressos com média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA-Tukey. \*\* $p < 0,001$  tratamento de 15 mg/kg comparado ao Grupo Tratado com 25 mg/kg, \*\*\* $p < 0,001$  tratamento de 25 mg/kg comparado ao Grupo Controle.

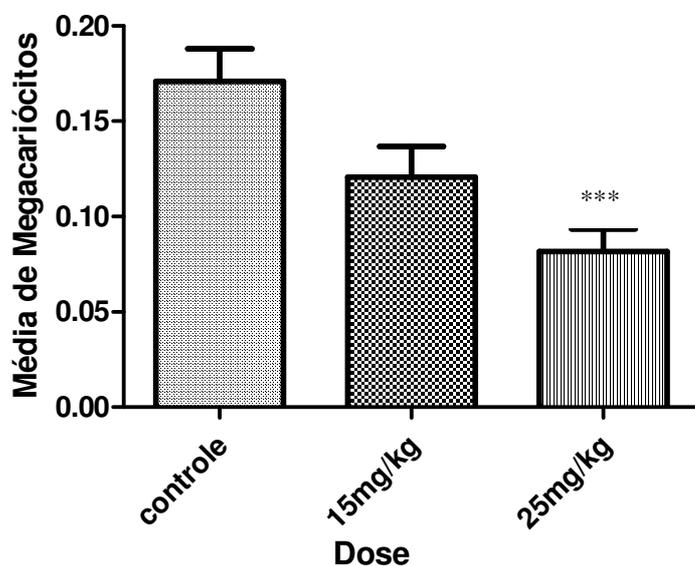


Figura 8. Análise da média dos megacariócitos nos grupos experimentais. Dados expressos com média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA-Tukey. \*\*\* $p < 0,001$  tratamento de 25 mg/kg comparado ao Grupo Controle.

**Tabelas**

Tabela1. Variáveis reprodutivas das fêmeas entre 0° e 20° dia de gestação tratadas com ácido úsnico purificado nas doses 15 e 25 mg/kg.

Variáveis	Grupo	Grupo Tratado	Grupo Tratado
	Controle	15 mg/kg	25 mg/kg
Número de fêmeas	6	6	6
Número de machos	3	3	3
Número de fêmeas preñas	6	6	6
Massa corporal 0° dia de gestação (g)	208 ± 4,3	209 ± 5,6	208 ± 5,2
Massa corporal 6° dia de gestação(g)	227± 1,4	227± 3,1	226 ± 5,8
Massa corporal 10° dia de gestação(g)	255 ± 3,4	236 ± 3,8***	224±5,8***
Massa corporal 14° dia de gestação(g)	276 ± 2,3	250 ± 2,8***	229±6,9***
Massa corporal 20° dia de gestação(g)	299 ± 2,5	279 ± 3,6***	247± 6,6***

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

Tabela 2. Efeito do ácido úsnico purificado sobre os parâmetros fetais.

Variáveis	Grupo	Grupo Tratado	Grupo Tratado
	Controle	15 mg/kg	25 mg/kg
Número de fetos viáveis por fêmeas	12 ± 0,5	10 ± 1*	8 ± 1,4***
Número de fetos não viáveis por fêmea	0	2 ± 0,8***	4,3 ± 0,8***
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-Tukey. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 comparado com o grupo controle.

## 5. CONCLUSÕES

A administração por gavagem do ácido úsnico, em ratas Wistar, durante o período da organogênese induziu toxicidade materna onde foi exibido redução no ganho de massa corporal durante o período da gestação levando a uma redução do peso dos fetos e do órgão analisado o fígado, além das malformações, redução no número de fetos viáveis e megacariócitos, mostrando que compostos naturais não são isentos de reações adversas e efeitos tóxicos sobre o organismo em desenvolvimento.

A administração da dose de 15 mg/kg levou a uma redução da toxicidade o que a torna uma candidata a novos estudos experimentais. Estes estudos revelam a importância de se avaliar os efeitos tóxicos de substâncias naturais a fim de elucidar os cuidados na sua utilização ou indicação com potencial fármaco.

## 6. ANEXOS

Normas da revista:

*Reproductive Sciences (RS)* (formerly the *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*) is the highly ranked and highly cited official publication of The Society for Gynecologic Investigation (SGI), whose mission is the advancement of knowledge in reproductive biology. The journal publishes original research and reviews, editorials, and position papers in all aspects of reproductive biology and its translation to clinical medicine, including the disciplines of maternal-fetal medicine, obstetrics, gynecology, reproductive endocrinology, fertility/infertility, gynecologic/reproductive tract oncology, developmental biology, embryology, stem cell research, molecular/cellular biology and related fields.

### **Editorial Policies**

Manuscripts are accepted for consideration on the condition that they are contributed solely to **RS**. No substantial part of a paper may have been published elsewhere, except for a scientific abstract. Manuscripts will be reviewed by the editor, members of the editorial board, and appropriate independent referees. If the article is accepted for publication, editorial revisions may be made to aid clarity and understanding without altering the meaning. Articles, reviews, and other text material in *RS* represent the opinion of the authors and do not necessarily represent the opinion of the editor, editorial board, or publisher. The editors and publisher deny any responsibility or liability for statements and opinions expressed by the authors. Neither the editor nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication, nor do they guarantee any claim made by the manufacturer of such product or service. Submission of a manuscript to the Journal is taken as evidence that no portion of the text or figures has been copyrighted, published, or submitted for publication elsewhere, unless information regarding previous publication is cited and permission obtained. A copy of permission obtained must accompany the manuscript. Transfer of copyright to the Society for Gynecologic Investigation is a condition of publication and must be signed upon submission and sent to Dr. Marie Rosa Maduro, Managing Editor, via fax at 203-785-7819, e-mail at [mariarosa.madura@yale.edu](mailto:mariarosa.madura@yale.edu), or mail to Maria Rosa Maduro, Yale School of Medicine, Dept. OB/GYN, P.O.

## **Manuscripts**

All manuscripts, questions, reviews, and announcements should be sent to: All manuscripts, questions, reviews, and announcements should be submitted electronically to <http://mc.manuscriptcentral.com/rsci>. Authors will be required to set up an online account on the SageTrack system powered by ScholarOne. All parts of the manuscript, including abstract, footnotes, tables, legends, quoted material, and case studies, must be typed double-spaced that is, with a full line of space after every typed line. Leave generous margins at least one inch on both sides and at the top and bottom of every page.

On the title page, please include the following information:

1. Names, degrees, and professional affiliation (position, department, institution, place) of all authors.
2. Name of the institution where the work reported was done.
3. Acknowledgment of grant support when appropriate.
4. Mailing address, telephone, and fax of corresponding author and e-mail addresses of all authors.

The *American Medical Association (AMA) Manual of Style* is the standard source of style. For more information on the *AMA Manual of Style*, please visit <http://www.sagepub.com>, click on “Journal Editors/Authors,” and then click on “Editor’s Guide.” Please view page 25 of the PDF for a brief overview of AMA style points.

Average time from submission to first decision: 33 days.

## **Abstract**

The abstract should be no longer than 150 words in length. The abstract should summarize the main points of the paper and be descriptive, narrative, and informative. At the bottom of the abstract, please also submit 3-5 keywords for your article.

## **Tables**

All tables must be cited in text. Tables are to be numbered with Arabic numerals (Table 1, Table 2) in order of their text citation. Each table should be typed (double-spaced throughout) on a separate sheet of paper and should have a title. Word table format is preferred. Each table should have a legend in sufficient detail to allow understanding without reference to the text.

## **Figure and Artwork Submission**

Artwork includes charts and graphs, maps, photographs, line art, and tables with 17 or more columns.

**Electronic Art** Acceptable file formats include the following: TIFF, EPS, JPEG, and PDF. Microsoft application files are acceptable for vector art (line art). Scanned Images Line art (black and white) images should be scanned as a bitmap at 900ppi. Photos should be scanned as grayscale or CMYK at 300ppi.

***There is a color charge of \$800 for the first figure and \$200 for each additional figure. Figures are published online in color at no charge.***

### **References**

References should be cited according to the *AMA Manual of Style*. In the text, please use a superscripted number that correlates with the reference at the end of the manuscript. When several references are cited simultaneously in the text, you can list the superscripted numbers together, for example, "Many researchers have debated this subject."<sup>1,2,5,9</sup>. Use "et al" for cites of 3 authors or more in text. However, in the references, list up to 6 authors. If there are more than 6 authors, list the first 3 authors and then "et al." Type references double-spaced at the end of the manuscript numbered in order of appearance in the manuscript. Unpublished data and personal communications should be given as references.

Manuscripts in press may be referenced; however, manuscripts that have been submitted for publication but have not been accepted yet should not be referenced.

### **Journals**

Michaud G, McGowan JL, van der Jagt R, et al. Are therapeutic decisions supported by evidence from health care research? *Arch Intern Med*. 1998;158:1665-1668.

### **Book Chapters**

Cole BR. Cystinosis and cystinuria. In: Jacobson HR, Striker GE, Klahr S, eds. *The Principles and Practice of Nephrology*. Philadelphia, Pa: BC Decker Inc; 1991:396-403.

### **Books**

Sackett DL, Straus SE, Richardson WS, et al. *Evidence-based Medicine: How to Practice and Teach EBM*. 2nd ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 2000.

### **Proofreading**

Prior to publication, the Publisher will send a copyedited and typeset PDF of the manuscript via e-mail to the corresponding author to review. Any corrections and alterations to the article should be submitted to the publisher prior to the deadline given in the e-mail. Authors are responsible for the accuracy of references and statistical computations.

***Announcements***

Announcements of meetings, conferences, and the like that are of interest to the readership of *RS* should be sent to the editor at least 3 months before the first day of the month of the issue in which the announcement should appear.

**Abstracting and Indexing:** Please visit <http://rsx.sagepub.com/> and click on the Abstracting/Indexing link on the left-hand side to view a full list of databases in which this journal is indexed.

**Advertising and Reprints**

Current advertising rates and specifications may be obtained by contacting the advertising coordinator at (805) 410-7160 or by sending an e-mail to [advertising@sagepub.com](mailto:advertising@sagepub.com). Reprints may be ordered by using the reprint order form that will accompany author proofs. If you need another copy of this order form, please call (805) 410-7763 or e-mail [reprint@sagepub.com](mailto:reprint@sagepub.com).

Authors who would like to refine the use of English in their manuscripts might consider using the services of a professional English-language editing company. We highlight some of these companies at <http://www.sagepub.com/journalgateway/engLang.htm>. Please be aware that SAGE has no affiliation with these companies and makes no endorsement of them. An author's use of these services in no way guarantees that his or her submission will ultimately be accepted. Any arrangement an author enters into will be exclusively between the author and the particular company, and any costs incurred are the sole responsibility of the author.

Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Ciências Biológicas  
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
 50670-420 / Recife - PE - Brasil  
 fones: (55 81) 2126 8940 | 2126 8381  
 fax: (55 81) 2126 8350  
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 24 de outubro de 2013.

Ofício nº 641/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
 Para: Prof.º Nicácio Henrique da Silva  
 Universidade Federal de Pernambuco  
 Departamento de Bioquímica e Fisiologia  
 Processo nº 23076.029828/2013-94

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, "*Estudo da Embriotoxicidade de Ácido Úsnico Livre e Encapsulado em Ratos Wistar*".

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, Fazenda, Aviário, Biotério do Departamento de Nutrição; Animais: Ratos Wistar; Idade: 90 dias; Peso: 300g. Sexo: macho e fêmea; Nº total de Animais: 45.

Atenciosamente,

Prof.ª Tania Rieger  
 Presidente da CEUA/CCB-UFPE  
 SAPE 2008/13