

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Graziela Tonioni de Queiroz

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA DO
EXTRATO HIDROALCOOLICO DE *Morus nigra* L. EM RATAS WISTAR (*Rattus
novergicus* BERKENHOUT, 1769)**

Juiz de Fora, Minas Gerais

2011

Graziela Tonioni de Queiroz

**Avaliação da atividade estrogênica do
extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. em ratas wistar (*Rattus norvegicus*
BERKENHOUT, 1769)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Martha de Oliveira Guerra

Juiz de Fora, Minas Gerais

2011

Graziela Tonioni de Queiroz

**Avaliação da atividade estrogênica do
extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. em ratas wistar (*Rattus norvegicus*
BERKENHOUT, 1769)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em de de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Martha de Oliveira Guerra (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Luciana Valente Borges
Universidade Tiradentes

Dra. Magda Narciso Leite
Universidade Federal de Juiz de Fora

“Dedico esta vitória aos meus pais José Neves e Marcy, ao meu irmão Josmar e ao meu noivo Renato que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, acreditando em mim e sabendo me dar força sempre que precisei”

Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam. (1Co 2:9b)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que é um Pai que ama e com esse amor me ensinou que o primeiro passo para a sabedoria é o silêncio; o segundo, a escuta e por ter me dado força e direção em todos os momentos da minha vida, não deixando eu fraquejar.

“Por que maior é aquele que está em vós do que aquele que está no mundo.” (1Jo 4:4b)

À minha mãe Marcy, que nos momentos mais tristes, alegres, nas vitórias, derrotas, dificuldades e decisões, esteve sempre segurando minha mão, me guiando, e incentivando. Obrigada pelo amor incondicional em todos os momentos, a você mulher virtuosa, que excede o valor de jóias preciosas.

“Não andeis ansiosos de cousa alguma.” (Fl 4:6a)

Ao meu pai José Neves que sempre me ensinou que trabalho duro, perseverança e honestidade são ferramentas ideais para atingirmos nossas metas.

Ao meu irmão Josmar pela amizade e companheirismo que tenho certeza, serão eternos.

Ao meu querido noivo Renato Brasil, uma pessoa maravilhosa que Deus colocou no meu caminho e que nos momentos mais difíceis do mestrado me ajudou com seu esforço, carinho, incentivo, amizade e acima de tudo esteve sempre ao meu lado. Obrigada por fazer parte da minha vida.

“O homem fiel será cumulado de bênçãos.” (Pv 29:20a)

À querida Prof^a Dr^a Martha de Oliveira Guerra, pelo privilégio de tê-la como minha orientadora, que com todo seu carinho, dedicação, sabedoria, me aceitou como aluna e ensinou-me a subir degrau por degrau para que hoje eu pudesse brilhar, o brilho do saber.

*“Fala com sabedoria e a instrução da bondade está na sua língua.”
(Pv 31:26)*

A Prof^a Dr^a Magda Narciso Leite, pelo incentivo, pela oportunidade de tornar o meu sonho realidade e por muitas vezes parar o que estava fazendo para me receber e prontamente me ajudar.

A Prof^a Dr^a Vera Maria Peters, pelo acolhimento, ajuda, e acima de tudo pelo exemplo de profissionalismo e perseverança.

A Rita de Cássia da Silveira e Sá, importante na minha formação acadêmica e incentivadora. Obrigada pelo conhecimento passado, crescimento e auxílio no mestrado.

“Águas profundas são as palavras da boca do homem, e a fonte da sabedoria, ribeiros transbordantes.” (Pv 18:4)

A amiga Tatianne Rosa dos Santos, pelas horas de estudos, conversas, desabafos, pelo incentivo, momentos de descontração, auxílio durante todas as tarefas e principalmente pela amizade construída.

A amiga Edith Bastos, pelas caronas, risadas, alegrias e amizade.

Aos funcionários, técnicos, estagiários, pesquisadores e amigos do CBR e do Biotério, não só pelo auxílio prático, mas também pelas boas horas de convívio diário, vocês ficarão para sempre em meu coração. Em especial ao Renato Macedo, por sua companhia e auxílio em todos os momentos do meu experimento, amizade e conhecimento que me passou.

Ao Centro de Biologia da Reprodução por proporcionar a estrutura para o desenvolvimento deste trabalho e as Redes Mineiras de Bioterismo (172/08) e de Toxicologia e Farmacologia de Produtos terapêuticos (173/08), FAPEMIG, Brasil, pelo financiamento do projeto.

Aos amigos e familiares de Juiz de Fora e Ubá, que mesmo de longe, que sempre estiveram torcendo por esta vitória.

A Miriam, Roberto, Roberta e Danilo pelo carinho, apoio e incentivo constante.

Aos mestres, por tudo que me ensinaram. Tudo o que aprendi devo a eles.

“Feliz a pessoa que acha sabedoria, e a pessoa que adquire conhecimento; porque melhor é o lucro que ela dá do que o da prata, e melhor a sua renda do que o ouro mais fino.” (Pv 3:13-14)

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira foram importantes para a realização dessa dissertação.

Muito obrigada!

“Porque, quando sou fraco, então, é que sou forte.” (II Co 12:10b)

RESUMO

A utilização de plantas medicinais com fins terapêuticos é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Devido à sua riqueza química e farmacológica, tem sido alvo de estudos na busca de comprovar as atividades atribuídas pela crença popular. *Morus nigra* L. é uma espécie pertencente à família Moraceae, conhecida popularmente como amoreira-preta. Na medicina popular tem sido utilizada na substituição da terapêutica da reposição hormonal convencional e também para aliviar sintomas da tensão pré-menstrual. A espécie apresenta elevada concentração de fenóis, flavonóides e antocianinas em seus frutos além de terpenóides e esteróides nas folhas, sendo a estas atribuídas atividades antioxidante, hipoglicemiante e antiinflamatória. Nenhum estudo relacionado à atividade estrogênica em animais inteiros, sobre toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento embrionário foi encontrado, sendo este o objetivo desse trabalho. Ratas Wistar, obtidas no biotério do Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora foram distribuídas nos grupos controle (1ml de água destilada) e tratados com 25, 50, 75, 350 e 700mg/kg do extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. (EHMn), por gavagem, por 15 dias consecutivos, mantendo-se durante o acasalamento e até o 14^o dia de gestação. Sinais clínicos de toxicidade foram observados 60 minutos após o tratamento e, posteriormente, uma vez ao dia. O ciclo estral foi avaliado diariamente até o encontro de espermatozóides (dia 1 pós-coito) e a massa corporal das fêmeas anotada a cada cinco dias. No 15^o dia de gestação, as fêmeas foram eutanasiadas por exsanguinação via punção cardíaca, sob anestesia. Variáveis analisadas: hemograma e bioquímica sanguíneos; peso de rins, fígado, baço e ovários; identificação e contagem de implantes, reabsorções, fetos vivos e mortos; massa corporal de fetos e peso de placentas. Através de cortes histológicos dos ovários e mensuração da altura do epitélio uterino foi avaliado a atividade estrogênica. Não foram encontradas diferenças significativas em nenhuma das variáveis estudadas, exceto em ALT (alanina aminotransferase), concluindo-se que o EHMn no modelo experimental apresentado, não demonstrou toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento embrionário, nem evidenciou atividade estrogênica.

Palavras chave: Ratas Wistar. Toxicologia. Reprodução. *Morus nigra* L.

ABSTRACT

The use of plants for treatment and prevention of diseases is one the oldest medicinal practices. Because of its rich chemistry and pharmacology, it has been investigated in the quest to prove the activities attributed by popular belief. *Morus nigra* L. is a specie belonging to the family of the Moraceae usually known as a black mulberry tree. In popular medicine it has been used in replacement of conventional therapy of hormonal replacement and also for relieving symptoms of premenstrual syndrome. The species has a high concentration of phenols, flavonoids and anthocyanins in their fruits as well as steroids and terpenoids in the leaves, these being attributed to antioxidant, hypoglycemic, anti-inflammatory activities. No studies related to estrogenic activity in whole animals, and reproductive toxicity was found in embryonic development, this being the aim of this work. Female wistar rats, obtained from the colony of the Center of Reproductive Biology - University Federal of Juiz de Fora, were distributed in the control groups (1 ml of distilled water) and treated with 25, 50, 75, 350 and 700mg/kg of the extract hidroalcoolic of *Morus nigra* L. (EHMn) by gavage for 15 consecutive days, maintaining during mating and until the 14th day of gestation. Clinical signs of toxicity were observed 60 minutes after treatment and thereafter once a day. The estrous cycle was evaluated daily until the meeting of sperm (day 1 post-coitus) and body mass of females recorded every five days. On the 15th day of gestation, females were euthanized by exsanguination through cardiac puncture under anesthesia. Analyzed variables: hematology and blood biochemistry, weight of kidney, liver, spleen and ovaries; identification and counting of implants, resorptions, live and dead fetuses; body weight of fetuses and placental weight. Using histological sections of ovaries and measuring the height of the uterine epithelium was evaluated estrogenic activity. There were no significant differences in any of the variables studied, except for ALT, concluding that the treatment with EHMn in the present experimental model, showed no reproductive toxicity and embryo development, showed no estrogenic activity.

Keywords: Female rats Wistar. Toxicology. Reproduction. *Morus nigra* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Ilustração 1: <i>Morus nigra</i> L..... | 17 |
| Ilustração 2: Lâminas a fresco no microscópio demonstrando a citologia vaginal de ratas. (A)-proestro; (B)-estro; (C)-metaestro; (D)-diestro. Adaptado de Marcondes <i>et al.</i> , 2002. | 24 |
| Ilustração 3 : Representação esquemática das principais classes de flavonóides. Fonte: Adaptado de Cerqueira <i>et al.</i> , 2007. | 26 |
| Ilustração 4: Semelhança estrutural molecular entre o estradiol e os fitoestrogênios quercetina e genisteína. Fonte: Adaptado de MENSE <i>et al.</i> , 2008. | 27 |
| Ilustração 5: Delineamento experimental..... | 34 |
| Ilustração 6: Coleta de células através do método de esfregaço vaginal..... | 35 |
| Ilustração 7: Corte histológico do útero de rata demonstrando a mensuração da altura do epitélio. | 37 |
| Ilustração 8: Fetos com 15 dias fixados em Bouin..... | 43 |
| Ilustração 9: Feto com 15 dias fixado em Bouin demonstrando as estruturas observadas na análise morfológica: (a)- pata dianteira (b)-pata traseira (c)-cauda, (d) tubo neural fechado. . | 43 |
| Ilustração 10: Tuba uterina do animal do grupo tratado com o extrato hidroalcoólico de <i>M. nigra</i> L. na concentração de 350 mg/Kg (T6) demonstrando a presença de ovócitos (setas). (10x). | 45 |
| Ilustração 11: Ovário de ratas Wistar durante a fase progestacional (A, B C) e estrogênica (D, E, F) demonstrando folículos em diferentes fases de desenvolvimento. Animais do grupo controle (A e D) e grupo tratado com extrato hidroalcoólico de <i>Morus nigra</i> L. 350mg/Kg (B e E) (T6), tratado com extrato hidroalcoólico <i>Morus nigra</i> L. 700mg/Kg (C e F) (T7) (10x). | 46 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis maternas de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o..... 40

Tabela 2: Análise bioquímica de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o..... 41

Tabela 3: Hemograma completo de ratas Wistar controle e tratadas do durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o..... 41

Tabela 4: Número total de corpos lúteos, implantes, fetos vivos, reabsorções, perdas pré-implantação, índice de implantação, perda pré-implantação, perda pós-implantação de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o..... 42

Tabela 5: Variáveis fetais, número médio de fetos vivos por grupo, peso médio de fetos por ninhada, peso médio placenta por ninhada, de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o. 43

Tabela 6: Porcentagem total das diferentes fases do ciclo estral de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o., N=15..... 44

Tabela 7: Altura do epitélio uterino de ratas Wistar controle e tratados com *Morus nigra* L. na concentração de 350mg/Kg e 700mg/Kg durante a fase estrogênica e progesterônica..... 45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Ganho de peso de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o., N=15. 39

Gráfico 2: Consumo de ração de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15º dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o, N=15..... 39

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| 2.1 Plantas medicinais | 15 |
| 2.2 <i>Morus nigra</i> L..... | 16 |
| 2.3 Menopausa | 19 |
| 2.4 Tensão pré-menstrual | 20 |
| 2.5 Estrogênio e sistema reprodutor feminino | 20 |
| 2.5.1 Ciclo estral..... | 22 |
| 2.5.2 Desenvolvimento embrionário inicial | 25 |
| 2.6 Flavonóides..... | 25 |
| 3 HIPÓTESE..... | 29 |
| 4 OBJETIVOS | 30 |
| 4.1 Geral | 30 |
| 4.2 Específicos | 30 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 5.1 Material | 31 |
| 5.1.1 Procedência e identificação de <i>Morus nigra</i> L..... | 31 |
| 5.1.2 Preparação do extrato | 31 |
| 5.1.3 <i>Screening</i> (triagem) fitoquímica..... | 32 |
| 5.1.4 Animais de experimentação..... | 32 |
| 5.1.5 Condições de criação e manutenção dos animais..... | 32 |
| 5.2 Métodos | 33 |
| 5.2.1 Delineamento experimental..... | 33 |
| 5.2.2 Avaliação da atividade estrogênica | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3 Análise estatística..... | 37 |
| 6. RESULTADOS | 38 |
| 6.1 Triagem fitoquímica | 38 |
| 6.2 Avaliação da toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento embrionário | 38 |
| 6.3 Avaliação da atividade estrogênica | 44 |
| 7 DISCUSSÃO | 47 |
| 8 CONCLUSÃO..... | 50 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |
| 10 APÊNDICE | 62 |

1 INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos são amplamente utilizados em diversos países com o objetivo de prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, com um custo mais acessível à população quando comparados aqueles obtidos por síntese química, que são, em geral, mais caros. Na África, por exemplo, 80% da população dependem do uso destes medicamentos que representam alternativas frente ao alto custo dos fármacos sintéticos (ASCHWANDEN, 2001). Muitas plantas são utilizadas com base somente no seu uso popular devido aos poucos estudos que comprovem sua eficácia (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Atualmente, apesar da grande variedade de produtos sintéticos disponíveis para o tratamento das doenças, a utilização de plantas medicinais que antes se concentrava nas populações do interior ou de baixa renda, tem seu uso cada vez mais difundido nas populações das cidades do Brasil e do mundo (BACCHI *et al.*, 1995; DI STASI *et al.*, 2002).

As plantas medicinais possuem efeitos indesejáveis menores quando comparadas a drogas sintéticas bem definidas. Entretanto, experimentos clínicos têm revelado que efeitos adversos também ocorrem com a utilização de plantas medicinais, e estudos toxicológicos bem controlados para provar a sua segurança são necessários, porém raros (CALIXTO, 2000).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) vem elaborando normas para a regulamentação destes medicamentos, desde a Portaria nº 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 17 de 2000, e a RDC nº 48 de 16 de março de 2004, atualmente em vigor, que dispõem sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2000, 2004). Estas normatizações dos medicamentos fitoterápicos exigem a avaliação da eficácia e segurança do uso destes medicamentos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006) que incluem, entre outros testes, a avaliação da toxicidade reprodutiva.

Informações populares atribuem ao “chá” (infuso ou decocto) de folhas de *Morus nigra* L., conhecida popularmente como amoreira ou amora preta, efeito semelhante ao obtido com o uso de estrogênio, sendo usado como substituto da terapêutica da reposição hormonal por mulheres no climatério (SILVA *et al.*, 2003; MIRANDA *et al.*, 2010), além da sua utilização para aliviar sintomas da tensão pré-menstrual. Estudos experimentais, entretanto, são controversos para verificar o efeito estrogênico esperado em um produto que alivia os

sintomas da menopausa (SILVA, *et al.*, 2003; VANONI, 2006; BOLZAN, 2008; CASTRO, 2010).

Foi detectada em frutos de *Morus nigra* L. elevada concentração de fenóis e flavonóides (ERCISLI e ORHAN, 2007) além de quatro tipos de antocianinas (PAWLOWSKA *et al.*, 2008), enquanto que nas folhas há a presença terpenóides e esteróides, β -sitosterol (PADILHA *et al.*, 2010). Sabidamente os flavonóides são compostos com capacidade de modular a atividade de distintas enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares.

Na literatura consultada não foram encontrados estudos relacionados à atividade estrogênica das folhas de *Morus nigra* L. em fêmeas adultas inteiras, isto é, não ooforectomizadas, tampouco relacionados à toxicidade reprodutiva e a do desenvolvimento embrionário, sendo este o objetivo desse trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

Planta medicinal é todo vegetal que contenha em toda a planta ou em um dos seus órgãos, componentes que possam ser usados para fins terapêuticos (OMS, 2000), seja como alívio ou cura de alguma enfermidade. Essa prática de tratamento é conhecida como Fitoterapia, e está embasada no uso terapêutico de plantas medicinais e na elaboração de medicamentos (DI STASI *et al.*, 2002).

As plantas medicinais têm sido utilizadas pela população em todo o mundo como matéria prima para tratamento, cura e prevenção de doenças. O seu uso para o tratamento de diversas enfermidades é uma prática com base na tradição popular de origem milenar, muitas vezes sem evidências científicas (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2005; FERRO, 2006; MACHADO, 2009). Sua atividade é dada através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações científicas ou publicações indexadas, podendo incluir fatores como crenças, carência econômica, dificuldade de acesso à assistência médica ou ainda por influência da mídia que promove produtos que contém em suas formulações plantas e outros componentes naturais (FERRO, 2006; MACHADO, 2009).

Em alguns países, o uso de plantas medicinais esta associado com bruxarias e superstição, uma vez que as pessoas não têm uma percepção científica para explicar a ação curativa das plantas (GURIB-FAKIM, 2006; VEIGA-JUNIOR e MELLO, 2008).

O consumo de plantas medicinais sob a forma de decoctos ou infusão, vulgarmente chamado de “chás” ou outras preparações, vem crescendo devido à grande procura pela população de alternativas naturais com menores custos, para prevenir e curar enfermidades, principalmente devido a evidências de efeitos colaterais de medicamentos sintéticos (VIEIRA, 2010 apud WAGNER e WISENAUER, 2006). As plantas medicinais geralmente contêm misturas de compostos químicos diferentes que podem agir individualmente, aditivamente ou em sinergia para melhorar a saúde (GURIB-FAKIM 2006; FONTELES *et al.*, 2008; LANINI *et al.*, 2009).

Na fitoterapia, as diversas partes das plantas como raízes, cascas, folhas, frutos e sementes são utilizados sob a forma de infusos ou decoctos (REZENDE e COCCO, 2002). A maior parte dos fitoterápicos utilizados atualmente não possui o seu perfil tóxico bem

conhecido (VEIGA-JUNIOR e MELLO, 2008) e as informações das evidências científicas sobre efeitos colaterais e intoxicações relacionadas ao uso de plantas medicinais dificilmente chegam à população atendida em serviços de saúde pública (SILVA *et al.*, 2006; ALEXANDRE *et al.*, 2008).

O Brasil possui uma grande variedade de plantas com potenciais medicinais não pesquisadas (FUCK *et al.*, 2005; VEIGA-JUNIOR e MELLO, 2008; LEITÃO *et al.*, 2009), que exigem estudos multidisciplinares envolvendo etnobotânicos, químicos, farmacólogos, agrônomos e outros profissionais de modo a torná-las utilizáveis pela população, atendendo as normas das agências reguladoras, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil e a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos.

A resolução da ANVISA, referente a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução da Diretoria Colegiada (R.D.C. 48), publicada em 16/03/2004 que permite o registro como fitoterápico apenas do derivado de droga vegetal, que é o produto de extração da matéria prima vegetal: extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco. Exige a identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas (BRASIL, 2004a).

Devido ao uso tradicional, poucas plantas medicinais foram analisadas através de estudos pré-clínicos e clínicos para comprovar a sua eficácia e segurança (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

2.2 *Morus nigra* L.

Morus nigra L., também conhecida popularmente como amoreira, amora preta ou negra, é uma espécie vegetal nativa das regiões temperadas e subtropicais da Ásia, África e América do Norte (WASANO *et al.*, 2009) estando plenamente aclimatizada no Brasil. Pertence ao gênero *Morus* e a família Moraceae, que apresenta crescimento rápido quando jovens, porém quando adultas o crescimento torna-se mais lento, não excedendo 15 metros de altura (PAWLOWSKA *et al.*, 2008). É uma árvore com casca ligeiramente rugosa, escura e copa grande, folhas de coloração mais ou menos verde e frutos grandes, ovalados, negros ou vermelhos brilhantes (Ilustração 1).



Ilustração 1: *Morus nigra* L.

(Fontes: A- luirig.altervista.org/schedeit/fo/morus_nigra.htm

B- secuidando.blogspot.com/2008/08/extrato-amora-folhas-morus-nigra-o.html)

As amoreiras são empregadas como árvore ornamental, paisagismo e na arborização urbana (NADERI *et al.*, 2004). As folhas têm grande importância econômica, pois constituem o alimento básico do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) em explorações comerciais (PAWLOWSKA *et al.*, 2008; ARAMWIT *et al.*, 2010). Os seus frutos podem ser utilizados para consumo “in natura” e para a produção de doces caseiros (KOYUNCU, 2004).

Entre os componentes químicos de espécies do gênero *Morus* sp. foram identificados: ácidos graxos, vitamina C, pertencentes ao metabolismo primário das plantas, além de fenilflavonoide (morusina), (PETLEVSKI *et al.*, 2001); flavonóides (NADERI *et al.*, 2004; LIN e TANG, 2007; ERCISLI e ORHAN, 2007; PAWLOWSKA *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2009), compostos fenólicos (ERCISLI e ORHAN, 2007; SONG *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010), ácidos orgânicos (KOYUNCU, 2004), antocianinas, carotenóides (DUGO *et al.*, 2001, HASSIMOTTO *et al.*, 2007), alcalóides (SONG *et al.*, 2009), substâncias resultantes do metabolismo secundário das plantas. Especificamente em *Morus nigra* foi detectada elevada concentração de fenóis e flavonóides em seus frutos (ERCISLI e ORHAN, 2007) além de quatro tipos de antocianinas (PAWLOWSKA *et al.*, 2008), enquanto que nas folhas foi identificado a presença terpenóides e esteróides, β -sitosterol (PADILHA *et al.*, 2010).

O estudo realizado por Ercisli e Orhan (2007) demonstrou que os frutos de *M. nigra* L. contêm maiores teores de substâncias fenólicas totais e flavonóides do que *M. rubra* L. e *M. alba* L. Também foram quantificados ácidos graxos, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro, manganês, zinco e cobre .

Sob o ponto de vista de uso medicinal a espécie *Morus nigra* tem sido utilizada na medicina popular como laxante, sedativa, expectorante, refrescante, emoliente, calmante, diurética, antidiabética, antiinflamatória, antioxidante, anti-séptica e indicada para dor de dente, eczema, inflamação bucal (gingivite, amigdalite, boca, garganta), tosse e vermes (ERCISLI e ORHAN, 2007).

Os frutos de *Morus nigra* L. são utilizados em processos inflamatórios, para estancar hemorragias (KOYUNCU, 2004), como diurético e expectorante. As folhas são usadas como antídoto para envenenamento decorrente de picadas de animais peçonhentos além da casca do tronco ser útil para dores de dentes (NADERI *et al.*, 2004).

O suco dos frutos da amora preta demonstrou atividade anti-estresse em camundongos possivelmente devido à captura de radicais livres (ânion superóxido, radical hidroxila) (SAKAGAMI *et al.*, 2006). Naderi *et al.*, (2004) evidenciaram também que extratos da fruta de *M. nigra* L. apresentam efeito protetor contra danos peroxidativos a biomembranas e a biomoléculas *in vitro*.

Padilha *et al.*, (2010) relataram que o extrato de cloreto de metileno das folhas de *Morus nigra* L. apresenta atividade antiinflamatória, e o extrato diclorometano efeito analgésico (PADILHA *et al.*, 2009) .

Foi observado que o extrato etanólico das folhas teve efeito hipoglicemiante em ratos com diabetes induzida por aloxano (PETLEVSKI *et al.*, 2001; ORYAN *et al.*, 2003).

Existem informações populares e citações na literatura não científica, de que a infusão de *Morus* sp. é utilizada por mulheres durante o climatério, na substituição da terapêutica da reposição hormonal convencional, com efeito semelhante ao obtido com o uso de estrogênio (SILVA *et al.*, 2003; MIRANDA *et al.*, 2010), além da sua utilização para aliviar sintomas da tensão pré-menstrual.

Estudos experimentais, entretanto, são controversos quanto aos testes usados para verificar efeito estrogênico em modelos animais ooforectomizados e púberes (SILVA, *et al.*, 2003; VANONI, 2006; BOLZAN, 2008; CASTRO, 2010). Silva *et al.*, (2003) avaliou o potencial estrogênico da infusão de folhas de *Morus* sp. em ratas Wistar ooforectomizadas através de análise histopatológica e histomorfométrica do útero e vagina, resultando em diferenças não significativas na morfologia dos órgãos analisados e na proporção de fase estrogênica, mensurada pela citologia vaginal. Igualmente, Vanoni (2006), avaliou o extrato hidroalcoólico e a infusão das folhas de *Morus nigra* L. em ratas Wistar adultas ovariectomizadas, pré-púberes e púberes, concluindo que nas doses administradas tanto a infusão como o extrato hidroalcoólico não apresentaram atividade estrogênica. Além disso,

Castro (2010), também avaliou a atividade estrogênica do extrato hidroalcoólico (EH) das folhas de *Morus nigra* em ratas Wistar ooforectomizadas, demonstrando que o tratamento crônico com o EH de *Morus nigra* nas doses avaliadas não apresentou toxicidade.

A atribuição popular leva a crer que as propriedades químicas presentes nas folhas da amora, possam amenizar os efeitos da menopausa e da tensão pré-menstrual, efeitos que sabidamente têm um componente hormonal como causador.

2.3 Menopausa

A menopausa é definida pela Organização Mundial de Saúde como a cessação permanente da menstruação, sendo reconhecida após 12 meses de amenorréia (OMS, 2000). O climatério delimita a passagem da vida reprodutiva para a não-reprodutiva, iniciando-se por volta dos 40 anos e terminando na sexta década, para a maioria das mulheres (SILVEIRA *et al.*, 2008). O principal aspecto biológico que ocorre neste período é a redução da produção dos hormônios esteróides sexuais pelos folículos ovarianos, principalmente estrogênio e progesterona (VIGETA e BRETÃS, 2004).

Devido ao hipoestrogenismo que se instala durante a menopausa, surgem sintomas vasomotores, atrofia vaginal, disfunções sexuais, fogachos, além do aumento de risco para doença cardiovascular e osteoporose. Fatores biopsicossociais podem determinar a ocorrência de manifestações psíquicas, exteriorizadas por irritabilidade, nervosismo, depressão e ansiedade (PEDRO *et al.*, 2003; GALVÃO *et al.*, 2007; CHEDRAUI *et al.*, 2007).

Durante a vida reprodutiva da mulher, o estrogênio ocupa um papel fundamental no desempenho de funções de vários sistemas do organismo, tais como cérebro, coração, ossos, aparelhos reprodutor e urogenital. Muitos desses efeitos benéficos podem ser estendidos ao período de vida posterior à menopausa, com a instituição e manutenção da terapia de reposição hormonal da menopausa (TRHM), que traz importantes benefícios à saúde da mulher, melhorando a sua qualidade de vida (VIGETA e BRETÃS, 2004; MATURANA *et al.*, 2007).

O princípio da TRHM é manter os níveis de estrogênio plasmáticos semelhantes aos da pré-menopausa, a partir da administração de estrogênio no organismo feminino (VIGETA e BRETÃS, 2004; MATURANA *et al.*, 2007).

2.4 Tensão pré-menstrual

Mulheres em idade reprodutiva apresentam sintomas cognitivos, emocionais e físicos relacionados ao seu ciclo menstrual. Irritabilidade intensa, acompanhada de humor depressivo, assim como inúmeras queixas psicossomáticas são sintomas recorrentes durante a fase lútea do ciclo menstrual. Esses sintomas têm recebido denominação de TPM, tensão pré-menstrual (RODRIGUES e OLIVEIRA, 2006; REIBER, 2008). A TPM é um complexo de sintomas que atinge cerca de 75 a 80% das mulheres em idade fértil, que pode trazer conseqüências importantes nas áreas pessoal, econômica e para a sociedade (BHATIA e BHATIA, 2002).

Segundo Dickerson *et al.* (2003), influências genéticas mediadas fenotipicamente através de neurotransmissores e neurorreceptores parecem ser bastante significativas na etiologia da TPM, mas a verdadeira causa da TPM ainda não está clara. Contudo há várias teorias para explicar os sintomas, todas sendo unânimes em apontar o meio hormonal da fase luteínica do ciclo menstrual, como determinantes do problema (SCHMIDT *et al.*, 1998; FRACKIEWICZ e SHIOVITZ, 2001).

A fase luteínica do ciclo menstrual corresponde ao período após a ovulação, em que o folículo ovariano sofre alterações estruturais e funcionais, começa a produzir hormônio progesterona, passando a ser denominado corpo lúteo. A progesterona e o estrogênio são responsáveis pela preparação do endométrio para a implantação do blastocisto. Se não houver a implantação nas duas semanas seguintes à ovulação, as taxas hormonais de estrogênio e progesterona entram em declínio, podendo trazer os sintomas da TPM que ocorre de cinco a dez dias antes da menstruação (VALADARES, 2006). Com a menstruação, os níveis hormonais voltam a elevar-se e os sintomas da TPM são aliviados.

2.5 Estrogênio e sistema reprodutor feminino

Os estrogênios são hormônios endógenos de grande importância que exercem profundos efeitos no desenvolvimento, na diferenciação e na homeostase metabólica de vários tecidos, incluindo as mamas, o sistema esquelético e o trato reprodutivo (GRUBER *et al.*,

2002; NILSSON e GUSTAFSSON, 2002; JORDAN, 2003; FRIEDRICH, 2003; OSBORNE e SCHIFF, 2005)

Entre os estrogênios naturais, encontra-se o 17- β -estradiol, estrona e estriol, sendo o 17- β -estradiol aquele que apresenta maiores concentrações sanguíneas e maior poder de ação nos diversos tecidos (GRUBER *et al*, 2002; GUYTON e HALL, 2008).

A síntese de estrogênios pode ocorrer em diversas partes do corpo como no tecido ósseo, no músculo esquelético, na pele, no tecido adiposo, folículos capilares, mas sua produção ocorre principalmente nas células da granulosa do folículo maduro (PETTERSSON e GUSTAFSSON, 2001).

Nos ovários, a produção de estrogênio ocorre a partir dos androgênios sendo regulada pelo hormônio luteinizante (LH) e pelo hormônio folículo-estimulante (FSH). As células da teca e as células granulosas dos ovários interagem para permitir essa síntese (BUSSIERE *et al.*, 2005). As primeiras possuem receptores para LH desde os folículos primários, e as últimas só adquirem receptores de FSH em um determinado estágio de desenvolvimento do folículo (GRUBER *et al*, 2002; HALL e PHILLIPS, 2005).

A união do LH aos receptores tecais produz testosterona, que se difunde pela membrana basal até as células da granulosa. Nestas o FSH modula a atividade da aromatase, uma enzima que processa a aromatização de testosterona em estradiol, um dos mais potentes estrogênios do organismo (GRUBER *et al*, 2002; BUSSIERE *et al.*, 2005). Logo após o estradiol é transportado no sangue ligado à albumina plasmática e a globulinas específicas até atingir os tecidos alvos (SOARES *et al.*, 2002; GRUBER *et al*, 2002). Onde houver receptores de estrogênio, haverá respostas específicas.

No sistema reprodutor feminino, a tuba uterina, útero e vagina são órgãos alvos que sofrem influência do estrogênio (HALBE, 2000; GUYTON e HALL, 2008).

Na tuba uterina ocorre o transporte de gametas, maturação e capacitação dos espermatozoides, fertilização dos ovócitos, formação do zigoto e início do desenvolvimento embrionário (YANAGIMACHI, 1994; MOORE, 2008). O epitélio tubário é composto por células ciliadas, secretoras e células musculares lisas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Receptores de estrogênio e progesterona são identificados no epitélio da tuba uterina, cuja expressão varia de acordo com as fases do ciclo ovariano (HARPER, 1994). O estrogênio induz aumento do número e do tamanho dos cílios das células, além de aumentar a contratilidade muscular, mecanismos necessários para o transporte de gametas, zigoto e embriões em fase de pré-implantação (HALBE, 2000; GUYTON e HALL, 2008). Alterações

na concentração hormonal do estrogênio podem causar falhas nos eventos que são realizados em seu interior.

Em ratas, o útero é constituído por um par de cornos uterinos independentes entre si. Caudalmente, esses cornos se unem formando um corpo uterino que se continua com a cérvix uterina única que desemboca na vagina. O endométrio, mucosa uterina, é composto por um epitélio cilíndrico simples, constituído por células secretoras ciliadas e células não ciliadas, apoiadas na membrana basal, e pelo estroma (HALBE, 2000; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; MOORE, 2008; GUYTON e HALL, 2008).

Durante a fase estrogênica no endométrio se observa proliferação marcante do estroma e glândula endometriais que posteriormente contribuirão para a nutrição do embrião implantado. No colo uterino, há incremento na produção de muco, mais fluido, que facilita a migração dos espermatozoides para o corpo do útero (HALBE, 2000; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; MOORE, 2008; GUYTON e HALL, 2008).

No útero, a secreção de estrogênios ovarianos é responsável por tornar o estroma uterino receptivo para a implantação, assim como por estimular a proliferação de células epiteliais do endométrio (PARIA *et al.*, 2000; CARSON *et al.*, 2000; SMITH, 2001; LEE e DEMAYO, 2004) e a progesterona é responsável pela implantação do blastocisto e manutenção da gravidez.

A mucosa vaginal é formada por tecido conjuntivo fibroso e vascularizado, revestido por um epitélio estratificado pavimentoso. Este epitélio é formado por células basais e intermediárias nucleadas, e células superficiais em diferentes estágios de queratinização. As alterações das células do epitélio vaginal são cíclicas, variando conforme a dominância dos hormônios estrogênio e progesterona, caracterizando o que é denominado ciclo menstrual em mulheres e ciclo estral em animais (HALBE, 2000; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; MOORE, 2008; GUYTON e HALL, 2008).

2.5.1 Ciclo estral

Os ciclos reprodutivos das fêmeas dos mamíferos são caracterizados pela secreção cíclica das gonadotrofinas hipofisárias e dos esteróides ovarianos que regulam a foliculogênese, induzem a ovulação, a formação do corpo lúteo e dão suporte ao transporte de

gametas, fertilização e desenvolvimento embrionário e fetal (FREEMAN, 1994; GOLDMAN *et al.*, 2007).

Ratas são animais que apresentam ovulação cíclica espontânea independente de alterações sazonais ou atividade sexual, sendo um excelente modelo experimental para os estudos de reprodução (SPORNITZ *et al.* 1999; MARCONDES *et al.*, 2002).

O ciclo reprodutivo de ratas, chamado de ciclo estral, é composto basicamente por quatro fases proestro, estro, metaestro e diestro, com duração de quatro a cinco dias. Estas fases são identificadas pelo acompanhamento dos tipos e quantidade de células que aparecem no lavado vaginal a fresco, denominado esfregaço vaginal (MARCONDES *et al.*, 2002). No estro, há o predomínio de células epiteliais cornificadas; no metaestro há células leucocitárias juntamente com número significativo de células epiteliais nucleadas. No diestro há predomínio de leucócitos e em proestro, observam-se células epiteliais nucleadas (FREEMAN, 1994; MARCONDES *et al.*, 2002).

O proestro tem duração média de 12 a 14 horas e nessa fase ocorrem picos de hormônio luteinizante (AGRA *et al.*, 2007), prolactina (PRL) e hormônio folículo-estimulante (FSH). Os folículos se desenvolvem e o útero se prepara para uma possível implantação durante o estro seguinte. O estradiol está em sua concentração máxima, desencadeando um feedback positivo que promove a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), indispensável para a ovulação (Ilustração 2) (FREEMAN, 1994; LI e DAVIS, 2007).

O estro tem duração média de 25 a 27 horas e é o período em que fêmea está receptiva ao macho para a cópula e o momento em que ocorre a ovulação. Nesta fase o hormônio progesterona encontra-se no seu nível máximo, sendo este de origem folicular (Ilustração 2) (FREEMAN, 1994; LI e DAVIS, 2007).

O metaestro, às vezes chamado de diestro-1, apresenta uma duração de 6 a 8 horas. A progesterona tem um segundo pico de concentração entre o metaestro e o diestro, porém esta é de origem lútea (Ilustração 2). O diestro, com duração de 55 a 57 horas, representa uma fase não fértil (Ilustração 2). Nesta fase há a ação inicial do estradiol sobre o organismo (FREEMAN, 1994; MARCONDES *et al.*, 2002; LI e DAVIS, 2007).

Vários fatores podem influenciar o ciclo estral como idade dos animais, luz, temperatura, umidade, ruídos, nutrição e relacionamento social (LI e DAVIS, 2007).

A luz é um fator essencial, pois uma vez que roedores são expostos a um estímulo luminoso contínuo, podem entrar em estado de estro permanente. Animais mantidos em curtos fotoperíodos podem apresentar também uma frequência estral reduzida e menor peso gonadal (TEIXEIRA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2003).

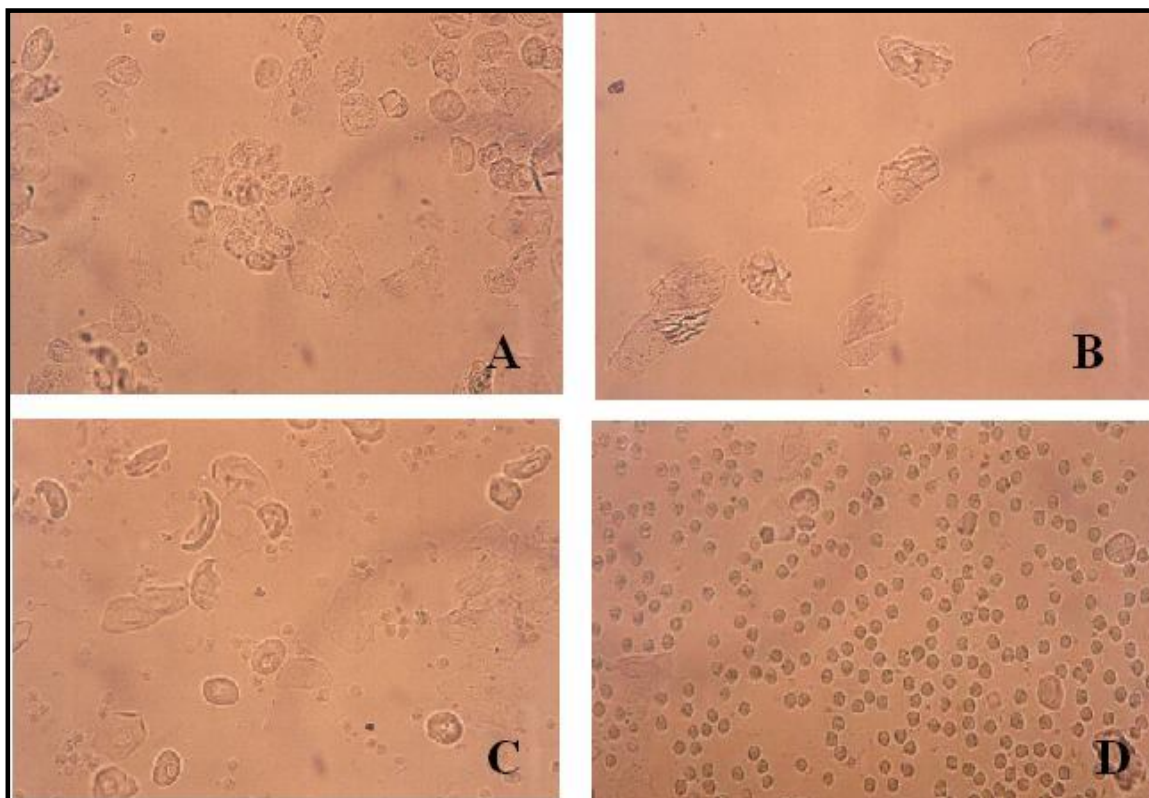


Ilustração 2: Lâminas a fresco no microscópio demonstrando a citologia vaginal de ratas. (A)-proestro; (B)-estro; (C)-metaestro; (D)-diestro. Adaptado de Marcondes *et al.*, 2002.

A principal medida para se avaliar a ciclicidade do ovário, em roedores, é o estudo da modificação das células encontradas no esfregaço vaginal (GOLDMAN *et al.*, 2007), um método exato, sensível e rápido que possibilita a identificação da fase do ciclo sem a necessidade de eutanásia (STOCKARD e PAPANICOLAU, 1917; LONG e EVANS, 1920). É utilizado em testes de toxicidade reprodutiva quando se procuram fatores que interferem com a concentração de hormônios ovarianos, uma vez que indicam, indiretamente, o estado funcional do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (GOLDAM *et al.*, 2007; LI e DAVIS, 2007).

A técnica para realização do esfregaço vaginal consiste na introdução e aspiração de água destilada na vagina da rata com auxílio de uma pipeta, conta-gotas ou cotonetes de algodão umedecidos a fim de se coletar as células da mucosa vaginal. O material colhido é depositados em lâminas de vidro para observação a fresco em microscópio óptico ou fixadas e coradas para análises futuras (GOLDMAN *et al.*, 2007).

2.5.2 Desenvolvimento embrionário inicial

Por facilidade didática considera-se o período embrionário inicial aquele que se inicia na fertilização e termina na implantação do blastocisto na parede do endométrio.

As fases iniciais de desenvolvimento embrionário também sofrem influências dos hormônios esteróides. A integridade e o tempo de transporte dos gametas e zigoto, fatores importantes para a fertilização e sobrevivência embrionária, são muito suscetíveis a perturbações causadas por compostos químicos. O transtorno desses processos auxilia na redução da taxa de fertilização e aumento da perda embrionária precoce, as perdas pré-implantação (EPA, 1996).

O transporte do embrião pela tuba uterina é acelerado sob efeito do estrogênio, devido ao aumento da contratilidade tubária (VINIJSAMUN *et al.*, 1990; CROXATTO *et al.*, 1991). O desenvolvimento dos estágios de zigoto a blastocisto requer a presença de estrógeno e progesterona. A concentração inadequada destes hormônios leva a diminuição do número de embriões e do número de células por embrião (PARIA *et al.*, 2001). O processo de implantação do blastocisto no endométrio também exige a sensibilização prévia pelo estrogênio, seguida da decidualização das células do estroma que, por sua vez, é uma etapa progesterona-dependente.

Em todas estas etapas, além dos hormônios ovarianos, têm papel importante prostaglandinas, fatores parácrinos produzidos localmente e outros de tal forma que qualquer interferência produzida por um xenobiótico leva a embriofetalidade, mas raramente à teratogenicidade (BERNARDI, 2002).

2.6 Flavonóides

Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presente entre os metabólitos secundários de vegetais (ZUANAZZI, 2000). São os fitoquímicos mais abundantes na dieta humana, sendo juntamente com outros compostos, responsáveis pela cor e odor de frutas e vegetais. Já foram identificados mais de 8000 diferentes flavonóides, sendo suas maiores classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas,

sendo que somente alguns, ou as formas substituídas em que eles se encontram, parecem estar relacionados a algum efeito biológico (YANG *et al.*, 2001; MARCHAND, 2002; CAMPOS, 2008). Na Ilustração 3 observam-se as estruturas dos flavonóides das principais classes já estudadas.

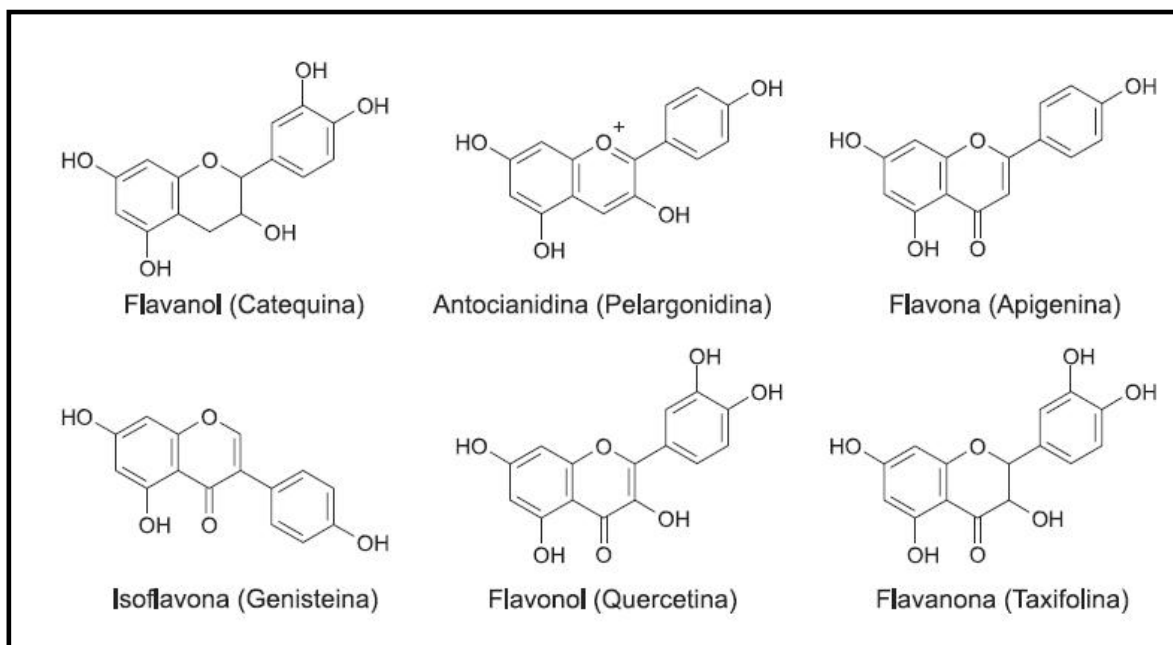


Ilustração 3 : Representação esquemática das principais classes de flavonóides. Fonte: Adaptado de Cerqueira *et al.*, 2007.

Os flavonóides são compostos presentes em muitas plantas medicinais utilizadas pela população (KALE *et al.*, 2008). O seu interesse econômico é decorrente da correlação entre suas estruturas e suas atividades biológicas (QUINTIN *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2007; RUSAK *et al.*, 2005; BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 2005; ABE *et al.*, 2002). Sua ação sobre os sistemas biológicos apresenta diversos efeitos farmacológicos e bioquímicos sendo reconhecidas as suas propriedades antioxidantes, antiulcerogênicas, antialérgicas, antidiarréicas, hepatoprotetoras, antinociceptivas, anti-anafiláticas, antiviral, antitumoral e formam quelatos com os metais agindo na alimentação, reprodução e desenvolvimento animal (OLIVEIRA *et al.* 1999).

Diversos constituintes flavônicos têm sido estudados, demonstrando sua atividade estrogênica ou antiestrogênica (SHIRAI, 2002). Substâncias derivadas de plantas com ação estrogênica ou antiestrogênica são denominadas fitoestrogênios, dentre estes, encontram-se os flavonóides (KURZER e XU, 1997; CORNWELL *et al.*, 2004). A propriedade agonista ou antagonista dos fitoestrógenos decorre da sua composição química semelhante aos estrogênios naturais e sintéticos (Ilustração 4) (IBARRETA *et al.*, 2001; JEFFERSON, 2003), permitindo a ligação ao receptores estrogênicos e a competição com os hormônios endógenos

(MIKSICEK, 1993; SKIBOLA e SMITH, 2000; IBARRETA *et al.*, 2001) assim como a inibição de enzimas envolvidas no metabolismo hormonal (SKIBOLA e SMITH, 2000).

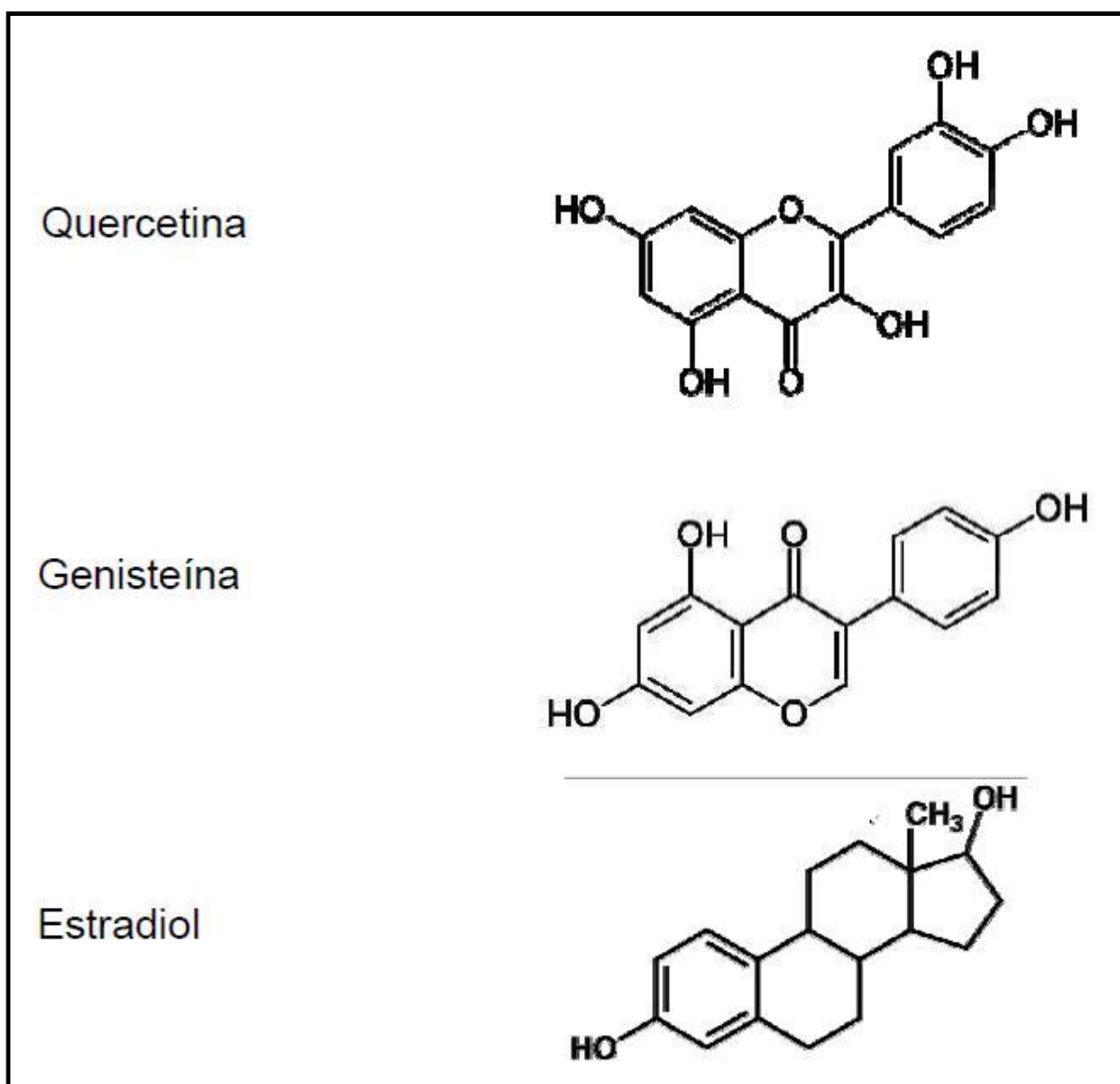


Ilustração 4: Semelhança estrutural molecular entre o estradiol e os fitoestrogênios quercetina e genisteína. Fonte: Adaptado de MENSE *et al.*, 2008.

Os fitoestrogênios são geralmente mais fracos que os estrógenos endógenos, porém, apresentam uma boa eficácia em concentrações ideais, capaz de produzir efeito estrogênico semelhante ao produzido pelo hormônio endógeno (MIKSICEK, 1993; IBARRETA *et al.*, 2001). As propriedades estrogênicas dos fitoestrógenos dependem da concentração dos mesmos, da concentração dos esteróides sexuais endógenos e do órgão alvo específico envolvido na interação com os receptores de estrogênios (RE). Isto decorre da existência de dois tipos de RE: α e β . Os α -receptores (RE- α) são os principais receptores encontrados na

mama e no útero, e os β -receptores (RE- β) no osso e no sistema cardiovascular. Os fitoestrógenos têm maior afinidade pelos receptores β , enquanto que o estradiol, por ambos receptores (CLAPAUCH *et al.*, (2002).

As principais classes dentre os flavonóides com efeitos estrogênico estão as isoflavonas, lignanas e coumestanos (ADLERCREUTZ, 2002; CORNWELL *et al.*, 2004; MOON *et al.*, 2006) sendo a classe das isoflavonas a mais estudada, e que apresenta como principais constituintes a genisteína, daidzeína, gliciteína, biochanina A e formononetina.

Na maioria das plantas, os flavonóides são encontrados na forma de glicosídeos (genisteína e daidzeína), isto é, ligadas a uma molécula de açúcar. Em geral, a absorção dos flavonóides glicosilados é baixa, sendo necessária hidrólise prévia para a sua forma aglicona a fim de serem mais bem absorvidos (DAY *et al.*, 1998; GEE *et al.*, 1998; GRAEFE *et al.*, 2001). Quando há a ingestão de flavonóides glicosilados, a β -ligação desses açúcares resiste à hidrólise pelas enzimas pancreáticas, sendo a microbiota intestinal responsável pela quebra das ligações glicosídicas (HEIM *et al.*, 2002).

3 HIPÓTESE

A exposição de ratas Wistar ao extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. apresenta atividade estrogênica em ratas adultas, altera a morfologia do sistema reprodutor e o desenvolvimento embrio-fetal.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar o efeito estrogênico de *Morus nigra* L. no sistema reprodutor de ratas Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) e no desenvolvimento embrionário.

4.2 Específicos

- a) Identificar indícios clínicos de toxicidade materna;
- b) Avaliar a morfologia do sistema reprodutor;
- c) Avaliar o desenvolvimento embrio-fetal.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Procedência e identificação de *Morus nigra* L.

As folhas de *Morus nigra* L. foram coletadas no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em Juiz de Fora/MG no mês de novembro de 2009. A planta foi identificada pelo Prof. Luiz Menine Neto no herbário Professor Leopoldo Krieger, onde a exsicata encontra-se depositada sob o número CESJ 48362.

5.1.2 Preparação do extrato

O extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. (EHMn) foi preparado no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF. Foram tomadas 50 g das partes aéreas de *Morus nigra* seca, trituradas e levadas a extração com etanol 70% em aparelho de Soxhlet até o esgotamento total da droga. Posteriormente, uma alíquota do extrato obtido foi rotaevaporado até resíduo total, sendo este mantido em estufa até secagem e peso constante. A partir desta alíquota, quantificou-se o teor de resíduo seco obtido, sendo este correspondente ao teor de 16%. O extrato restante foi rotaevaporado até eliminação completa de etanol e a solução obtida foi filtrada por algodão. Esta solução aquosa foi utilizada para produzir três extratos. O extrato A cuja concentração final foi de 16 mg/mL; o extrato B cuja concentração final foi de 50 mg/mL e o extrato C cuja concentração foi de 105 mg/mL. O extrato A foi utilizado para tratamento de três grupos experimentais. Ao grupo que deveria receber a dose de 75 mg/Kg foi administrado 0,7 mL de solução; ao grupo que deveria receber a dose de 50 mg/Kg foi administrado 0,5 mL; e ao grupo que deveria receber a dose de 25 mg/Kg foi administrado 0,25 mL. Ao grupo que deveria receber a dose de 350 mg/Kg foi

administrado 1 mL do extrato B. Ao grupo que deveria receber 700 mg/Kg foi administrado 1 mL do extrato C.

5.1.3 *Screening* (triagem) fitoquímica

A análise fitoquímica das folhas de *Morus nigra* L. foi realizada, segundo Matos (1997), a fim de verificar a presença das seguintes classes de produtos do metabolismo secundário através de reações de identificação: flavonóides (reação com AlCl_3 , reação com H_3BO_3 , reação com NaOH 1N, reação de Shinoda), taninos (reação com acetato de chumbo, reação com sais de cobre, reação com sais de ferro, reação com alcalóides e reação com gelatina), cumarinas (reação com KOH 5%), heterosídeos esteróides (reação de Kedde, reação de Libermann-Buchard, reação de Baljet), saponinas (índice de espuma), alcalóides (reação de Bertrand, reação de Bouchardat, reação de Dragendorff e reação de Mayer) e antraquinonas (reação de Borntraeger).

5.1.4 Animais de experimentação

Foram utilizadas 105 ratas da linhagem Wistar, nulíparas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) provenientes da colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF com idade de, aproximadamente, 60 dias e massa corporal variando entre 120 a 170g.

5.1.5 Condições de criação e manutenção dos animais

Os animais foram mantidos no biotério do CBR-UFJF, sendo alojados em gaiolas de polipropileno, forradas com camas de maravalha (não esterilizada), dotadas de cocho para ração do tipo peletizada e local para mamadeira com água filtrada. As gaiolas foram alojadas em gabinetes climatizados, dispoindo de trocas de ar e umidade relativas controladas (40-

60%). Os gabinetes climatizados estavam localizados em alojamentos com fotoperíodo controlado de 12h de ciclo claro/escuro, temperatura $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ controlada por aparelhos de ar condicionado. Cada animal recebeu 25g de ração comercial da marca Nuvilab diariamente e água filtrada *ad libitum*.

5.2 Métodos

5.2.1 Delineamento experimental

Foi seguido o protocolo do *International Comite for Harmonization* – estágio I, (ICH, 2005) com pequenas modificações descritas adiante.

Para a avaliação da toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento embrionário de *Morus nigra* L., noventa animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos de quinze ratas cada, compreendendo: [1] T1(EHMn 25mg/Kg); [2] T2(EHMn 50 mg/Kg); [3] T3 (EHMn 75mg/Kg); [4] T4(EHMn 350 mg/Kg); [5] T5(EHMn 700mg/Kg); [6] Controle (água destilada). A dose de 700mg/kg foi baseada naquela utilizado por VANONI (2006) e as demais doses foram a intervalos decrescentes desta concentração.

Na avaliação da atividade estrogênica quinze animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de cinco animais cada: [7] T6 (EHMn 350 mg/Kg); [8] T7(EHMn 700mg/Kg); [9] Controle (água destilada) (Ilustração 5).

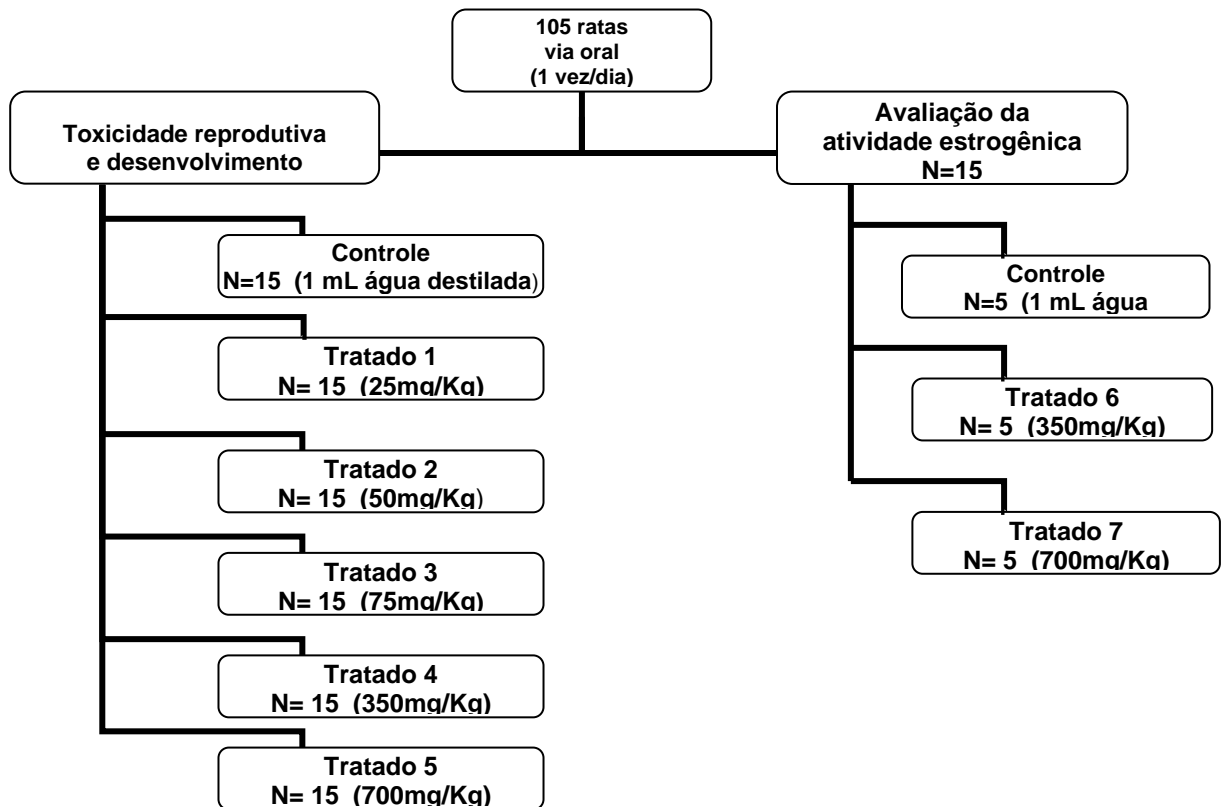


Ilustração 5: Delineamento experimental

5.2.2 Toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento embrionário

Após 15 dias de tratamento com o EHMn, administrado diariamente por via intragástrica, as ratas foram acasaladas com machos de fertilidade comprovada (2 fêmeas: 1 macho), mantendo os tratamentos até o 14^o dia pós-inseminação. Foi considerado o primeiro dia pós-inseminação aquele em que se determinou a presença de espermatozóides no esfregaço vaginal (KESHRI *et al.*, 2003), realizado todos os dias, às 8 horas da manhã, desde o início do tratamento, sendo o material coletado através do lavado vaginal examinado a fresco em microscópio óptico (Ilustração 6)

Durante 60 minutos após o tratamento e, posteriormente, uma vez ao dia as fêmeas foram observadas para identificação de indícios clínicos de toxicidade: pêlos eriçados, estereotipia, hiper ou hipo-atividade no interior da gaiola, diarreia, sialorréia, poliúria ou morte, segundo Christian, (2001).

No 15^o dia de gestação os animais foram eutanasiados por exsanguinação, mediante punção cardíaca, realizada sob anestesia com Ketamina 2% (10mg/Kg) e Xilasina 5% (90mg/Kg) por via intraperitoneal. Após a laparotomia, trato reprodutor feminino, fígado, rins e baço foram removidos e pesados em balança de precisão. Quaisquer alterações nos órgãos internos eram anotadas. Os ovários foram pesados e tiveram os corpos lúteos contados sob microscópio estereoscópico. Os cornos uterinos foram seccionados longitudinalmente para contagem de fetos vivos (batimento cardíaco presente) e mortos. Os fetos e placentas foram pesados separadamente, obtendo-se o peso médio da ninhada bem como o peso médio da placenta. Posteriormente, os fetos foram fixados em Bouin por 60 minutos e observados em microscópio estereoscópico para identificação de alterações de membros superiores e inferiores, morfologia da face e verificação do fechamento do tubo neural.



Ilustração 6: Coleta de células através do método de esfregaço vaginal

Total de fetos vivos, de corpos lúteos, número de reabsorções e total de implantes foram determinados para cálculo das taxas de implantes por grupo (total de implantes / total

de corpos lúteos) x 100; de perdas pré-implantação por grupo (100 – taxa de implantação), e de perdas pós-implantação por grupo [(total de reabsorções + total de fetos mortos) / total de implantes] x 100 (PARKER, 2006).

Durante todo o período de tratamento foi feita à estimativa do consumo de ração de todas as ratas pela diferença de peso da ração colocada em um dia (25g) e a sobra obtida no dia seguinte, assim como a verificação da massa corporal de cada animal no início do tratamento e, posteriormente, de cinco em cinco dias até a data da eutanásia.

No sangue coletado foi realizado hemograma completo e dosagem de colesterol, creatinina, Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT).

Para as análises bioquímicas e hematológicas, o sangue coletado foi separado em dois tubos, um contendo anticoagulante etilenodiamino-tetracético-dissódico (EDTA K2), marca Hemstab (laboratório Labtes) e outro sem coagulante.

Nas análises bioquímicas, as amostras sanguíneas sem anticoagulante foram centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos para a obtenção do soro. Foram determinados os níveis séricos de AST ou TGO, ALT ou TGP, creatinina e colesterol, utilizando-se o aparelho analisador bioquímico Labmax Progress (Labtest), por meio de kits comerciais específicos (Labtest),

No sangue anticoagulado, os valores totais de eritrócitos (Htm), hematócrito (Htc) e leucócitos, a concentração de hemoglobina (Hb), assim como os índices hematimétricos (VGM – volume globular médio, HGM – hemoglobina corpuscular média, CHGM – concentração de hemoglobina corpuscular média), foram mensurados em contador automático de células (CELM CC-550).

As análises bioquímicas e hematológicas foram realizadas no laboratório de bioquímica do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF.

5.2.3 Avaliação da atividade estrogênica

Para avaliar o efeito estrogênico os animais foram tratados durante 15 dias consecutivos, uma vez ao dia por gavagem, sendo determinado a ciclicidade através da citologia vaginal, obtida por esfregaço vaginal realizado diariamente às 8 horas da manhã. No 16^o dia os animais foram eutanasiados por sobredose de anestesia com Ketamina 2% (10mg/Kg) e Xilasina 5% (90mg/Kg) por via intraperitoneal. Ovários e útero foram

removidos e fixados em formol cálcio de Baker, incluídos em parafina, seccionados a $5\mu\text{m}$ e os cortes, corados com Hematoxilina-Eosina. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico para avaliação da morfologia uterina e do ovário. Foram feitas capturas de imagens usando microscópio de luz acoplado a uma câmera de vídeo (AxioCam IcC3, Carl Zeiss, Jena Alemanha). Em cortes transversais do útero foi medida a espessura do epitélio, utilizando o software de análise de imagem (AxioVision 4.7 REL Carl Zeiss, Jena, Alemanha) (Ilustração 6). Foram feitas 8 medições em cada corte histológico por grupo.

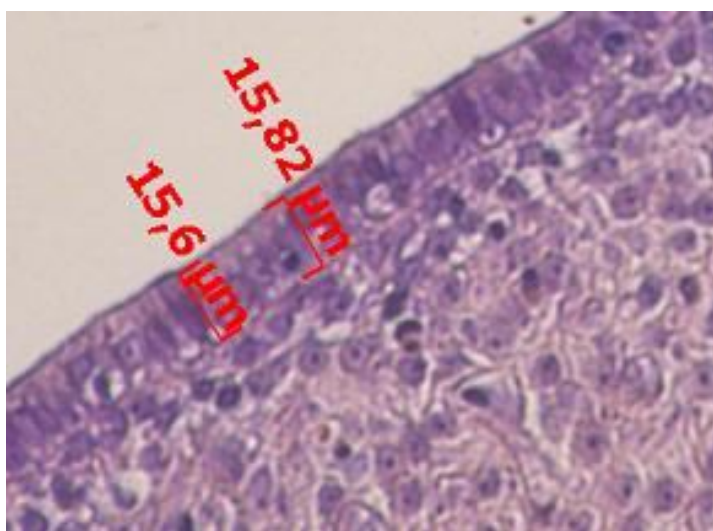


Ilustração 7: Corte histológico do útero de rata demonstrando a mensuração da altura do epitélio.

5.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnett. Para dados não homocedásticos e sem distribuição normal foi usado teste Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney. O nível de significância dos testes foi de $\alpha=0,05$.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, sob o protocolo de nº 048/2009.

6 RESULTADOS

6.1 Triagem fitoquímica

Na avaliação fitoquímica das folhas de *Morus nigra* L. foi possível detectar a presença de taninos, flavonóides, triterpenos/esteróides e cumarinas.

6.2 Avaliação da toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento embrionário

Os dados obtidos dos animais tratados durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação, mostraram que a administração do extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. nas doses de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg não provocaram alteração significativa no ganho de peso corporal (Gráfico 1) e nem interferiram no consumo de ração (Gráfico 2).

Durante os procedimentos experimentais, nenhuma morte, alteração da atividade locomotora, ocorrência de piloereção ou qualquer outro sinal clínico de toxicidade foram observados nos animais.

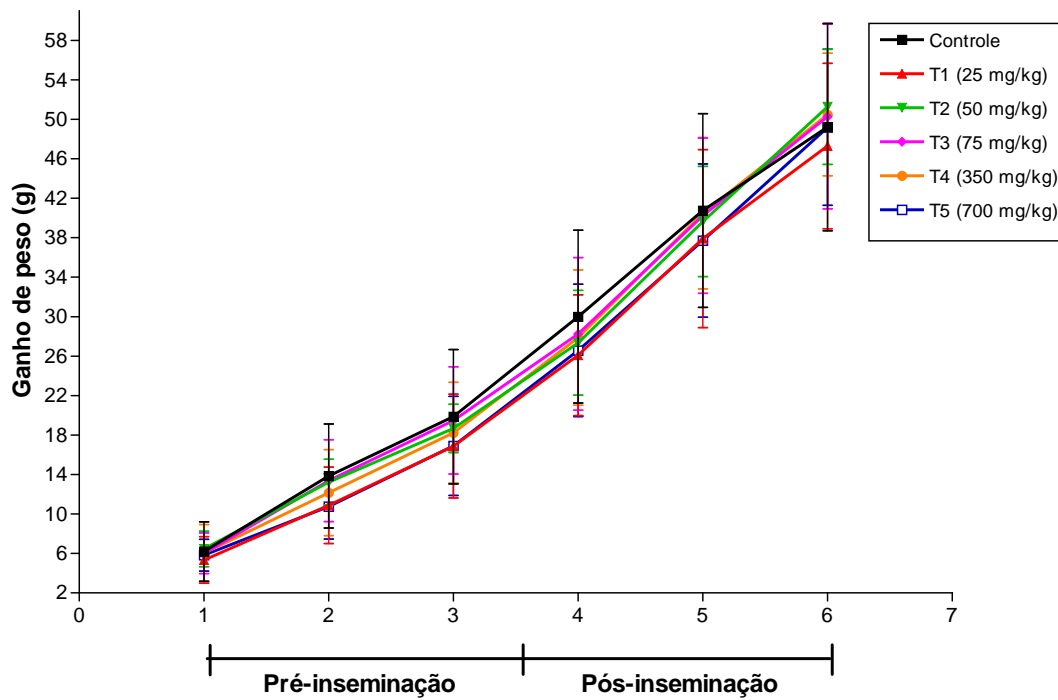


Gráfico 1: Ganho de peso de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o., N=15.

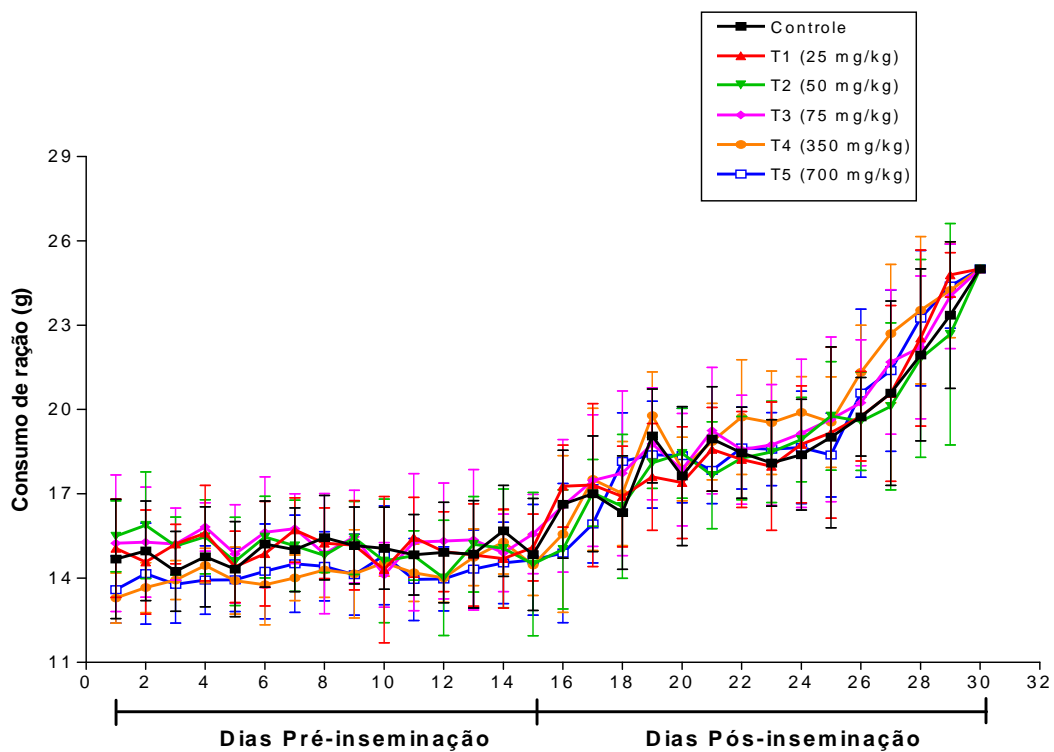


Gráfico 2: Consumo de ração de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15º dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o., N=15.

Nas variáveis maternas das ratas eutanasiadas no 15^o dia pós-inseminação, não foi observada alteração significativa no peso dos ovários dos animais tratados com o extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. quando comparados aos pesos encontrados nos animais do grupo controle, assim como nos demais órgãos internos, fígado, rins e baço (Tabela 1).

Tabela 1: Peso de órgãos de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o.

| Variáveis maternas | Grupos | | | | | |
|---------------------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | Controle | T1 (25mg/Kg) | T2 (50mg/Kg) | T3 (75mg/Kg) | T4 (350mg/Kg) | T5 (700mg/Kg) |
| Fígado: | | | | | | |
| <i>peso absoluto (g)</i> | 7,72 ± 0,53 | 7,44 ± 0,88 | 7,52 ± 0,56 | 7,79 ± 0,93 | 7,55 ± 0,50 | 7,17 ± 0,60 |
| <i>peso relativo</i> | 4,01 ± 0,20 | 3,89 ± 0,44 | 3,94 ± 0,26 | 3,98 ± 0,32 | 4,01 ± 0,21 | 3,92 ± 0,22 |
| *Rim: | | | | | | |
| <i>peso absoluto (g)</i> | 0,75 ± 0,05 | 0,71 ± 0,04 | 0,73 ± 0,06 | 0,75 ± 0,06 | 0,71 ± 0,05 | 0,68 ± 0,04 |
| <i>peso relativo</i> | 0,39 ± 0,02 | 0,37 ± 0,02 | 0,38 ± 0,03 | 0,38 ± 0,02 | 0,37 ± 0,02 | 0,37 ± 0,01 |
| Baço: | | | | | | |
| <i>peso absoluto (g)</i> | 0,53 ± 0,07 | 0,54 ± 0,09 | 0,52 ± 0,06 | 0,53 ± 0,04 | 0,47 ± 0,06 | 0,48 ± 0,06 |
| <i>peso relativo</i> | 0,27 ± 0,03 | 0,28 ± 0,04 | 0,27 ± 0,03 | 0,27 ± 0,02 | 0,25 ± 0,02 | 0,26 ± 0,02 |
| Ovário: | | | | | | |
| <i>peso absoluto (mg)</i> | 32,32 ± 2,80 | 30,86 ± 3,81 | 31,56 ± 4,07 | 30,76 ± 5,68 | 30,73 ± 4,68 | 27,61 ± 4,64 |

Resultados expressos em média ± desvio padrão. N = 15. P>0,05 *peso médio do rim esquerdo e direito.

Os resultados obtidos das análises bioquímicas e hemograma dos animais eutanasiados no 15^o dia de gestação estão expressos nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Nas análises bioquímicas pode-se observar um aumento significativo nos valores de ALT dos animais tratados com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. na concentração de 700mg/kg quando comparado com o grupo controle. Os demais valores encontrados não diferiram significativamente em relação ao grupo controle.

Tabela 2: Análise bioquímica sérica de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o.

| Variáveis | Grupos | | | | | |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------|
| | Controle | T1 (25mg/Kg) | T2 (50mg/Kg) | T3 (75mg/Kg) | T4 (350mg/Kg) | T5 (700mg/Kg) |
| Colesterol (mg/dL) | 48,41 ± 6,14 | 52,30 ± 8,31 | 47,33 ± 5,19 | 53,83 ± 9,63 | 46,20 ± 3,27 | 45,93 ± 7,12 |
| A.S.T. (U/L) | 111,08 ± 16,98 | 139,92 ± 42,81 | 133,50 ± 33,50 | 125,25 ± 25,39 | 102,53 ± 20,29 | 127,53 ± 37,67 |
| A.L.T. (U/L) | 72,58 ± 9,44 | 79,61 ± 15,30 | 77,33 ± 13,08 | 81,16 ± 10,59 | 72,40 ± 9,31 | 96,06 ± 24,67 * |
| Creatinina (mg/dL) | 0,50 ± 0,04 | 0,53 ± 0,08 | 0,51 ± 0,06 | 0,50 ± 0,09 | 0,54 ± 0,06 | 0,54 ± 0,07 |

Resultados expressos em média ± desvio padrão. N = 15. * p<0,05 em relação ao controle
AST – Aspartato aminotransferase; ALT – Alanina aminotransferase

O hemograma não revelou alteração significativa nos valores analisados entre os animais do grupo controle e tratado com o extrato hidroalcoólico de *Morus nigra*.

Tabela 3: Hemograma completo de ratas Wistar controle e tratadas do durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o.

| Variáveis | Grupos | | | | | |
|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | Controle | T1 (25mg/Kg) | T2 (50mg/Kg) | T3 (75mg/Kg) | T4 (350mg/Kg) | T5 (700mg/Kg) |
| Hb (g/dL) | 12,73 ± 0,64 | 12,46 ± 0,61 | 12,66 ± 0,63 | 12,26 ± 0,93 | 12,91 ± 0,51 | 12,72 ± 0,80 |
| Htc (%) | 38,84 ± 3,24 | 39,15 ± 3,85 | 39,46 ± 4,51 | 38,60 ± 5,78 | 39,48 ± 1,93 | 39,16 ± 2,27 |
| Htm (cel/mm ³) | 6564000,00 ± 334082,96 | 6460000,00 ± 327283,18 | 6664000,00± 380146,58 | 6273400,00 ± 486649,4 | 6263800,00 ± 403862,81 | 6319333,33± 312443,51 |
| Leucócitos (cel/mm ³) | 5260,00 ± 1445,09 | 5173,33 ± 1061,31 | 5293,33 ± 912,19 | 5160,00 ± 1633,05 | 5060,00 ± 1329,76 | 5266,66 ± 924,01 |
| VGM (fL) | 59,50± 4,06 | 60,62 ± 3,44 | 60,88 ± 4,00 | 61,43 ± 5,09 | 63,17 ± 3,16 | 59,77 ± 6,44 |
| HGM (pg) | 19,50 ± 0,70 | 19,39 ± 0,70 | 18,91 ± 0,92 | 19,76 ± 1,54 | 19,98 ± 0,78 | 19,99 ± 0,79 |
| CHGM (%) | 33,00 ± 2,32 | 32,11 ± 1,86 | 31,08 ± 2,81 | 32,70 ± 4,19 | 32,12 ± 1,59 | 33,84 ± 3,00 |

Resultados expressos em média ± desvio padrão. N = 15. P>0,05

Hb – hemoglobina; Htc – hematócrito; Htm – eritrócito; VGM – volume globular médio; HGM – hemoglobina globular média; CHGM – concentração de hemoglobina globular média

Os dados relativos à capacidade reprodutiva das fêmeas tratadas durante os 15 primeiros dias de gestação com o extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. não demonstraram alteração em relação ao grupo controle (Tabela 4). As variáveis expressam o número total de corpos lúteos, implantes, fetos vivos, reabsorções, perdas pré-implantação por grupo e os índices de implantação, perdas pré-implantação e perdas pós-implantação.

Tabela 4: Número total de corpos lúteos, implantes, fetos vivos, reabsorções, perdas pré-implantação, índice de implantação, perda pré-implantação, perda pós-implantação de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15^o-dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o.

| Variáveis | Grupos | | | | | |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Controle | T1 (25mg/Kg) | T2 (50mg/Kg) | T3 (75mg/Kg) | T4 (350mg/Kg) | T5 (700mg/Kg) |
| Corpos Lúteos | 176 | 166 | 177 | 166 | 176 | 166 |
| Implantes | 167 | 156 | 167 | 153 | 166 | 152 |
| Fetos Vivos | 161 | 152 | 163 | 148 | 158 | 144 |
| Reabsorções | 6 | 4 | 4 | 5 | 8 | 8 |
| Perdas pré-implantação | 9 | 10 | 10 | 13 | 10 | 14 |
| Implantação/grupo (%) | 94,88 (167/176) | 93,97 (156/166) | 94,35 (167/177) | 92,16 (153/166) | 94,31 (166/176) | 91,56 (152/166) |
| Perda pré-implantação/grupo (%) | 5,11 (9/176) | 6,02 (10/166) | 5,64 (10/177) | 7,83 (13/166) | 5,68 (10/176) | 8,43 (14/166) |
| Perda pós-implantação/grupo (%) | 3,59 (6/167) | 2,56 (4/156) | 2,39 (4/167) | 3,28 (5/153) | 4,81 (8/166) | 5,26 (8/152) |

Resultados expressos em média \pm desvio padrão. N = 15. P>0,05

As variáveis fetais, número médio de fetos vivos por grupo, peso médio de fetos por ninhada, peso médio placenta por ninhada, dos animais eutanasiados no 15^o dia de gestação não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5: Variáveis fetais, número médio de fetos vivos por grupo, peso médio de fetos por ninhada, peso médio placenta por ninhada, de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o.

| Variáveis | Grupos | | | | | |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Controle | T1 (25mg/Kg) | T2 (50mg/Kg) | T3 (75mg/Kg) | T4 (350mg/Kg) | T5 (700mg/Kg) |
| Fetos vivos/grupo | 10,73 ± 1,22 | 10,13 ± 1,06 | 10,86 ± 0,99 | 9,86 ± 2,13 | 10,53 ± 1,92 | 9,40 ± 1,40 |
| Peso fetos/ ninhada (mg) | 164,56 ± 12,95 | 164,20 ± 9,42 | 166,91± 11,93 | 162,61 ± 7,10 | 167,33 ± 8,91 | 168,55 ± 9,78 |
| Peso placentas/ninhada (mg) | 140,29 ± 15,42 | 144,82 ± 20,45 | 140,71 ± 15,68 | 140,41 ± 24,27 | 150,72 ± 15,10 | 145,81 ± 22,24 |

Resultados expressos em média ± desvio padrão. N = 15. P>0.05.

Os fetos que foram fixados em Bouin para análise, não apresentaram malformações externas grosseiras visíveis a olho nu (Ilustração 7).

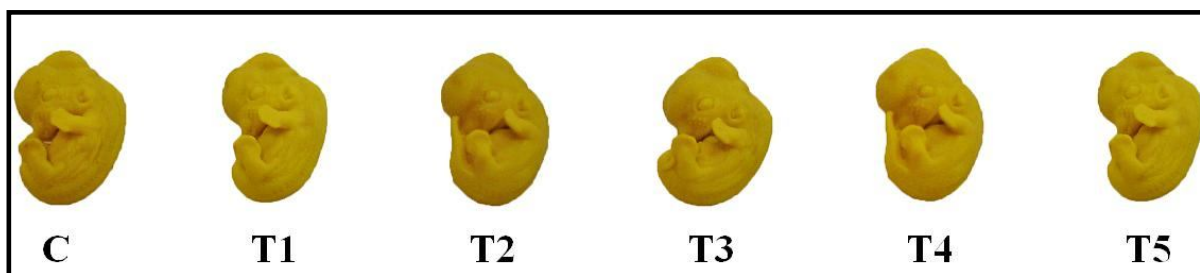


Ilustração 8: Fetos com 15 dias fixados em Bouin

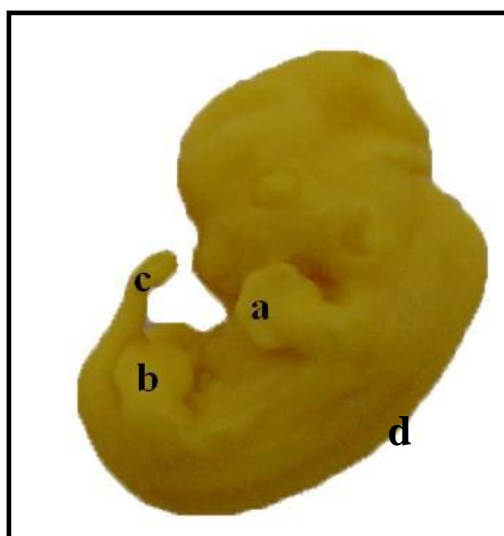


Ilustração 9: Feto com 15 dias fixado em Bouin demonstrando as estruturas observadas na análise morfológica: (a)- pata dianteira (b)-pata traseira (c)-cauda, (d) tubo neural fechado.

6.3 Avaliação da atividade estrogênica

O estudo da citologia vaginal das ratas Wistar obtido por meio da realização diária do esfregaço vaginal e identificação dos tipos celulares característico de cada fase (proestro: células epiteliais nucleadas, estro: células queratinizadas) - fase estrogênica e (diestro: células do tipo leucócitos) - fase progestacional, durante o período de pré-inseminação, 1-15^o dia, tratadas com o extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas doses de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg apresentou ciclos estrais normais consecutivos (Tabela 6).

Tabela 6: Porcentagem total das diferentes fases do ciclo estral de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o., N=15.

| Variáveis | Grupos | | | | | |
|---------------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | Controle | T1 (25mg/kg) | T2 (50mg/kg) | T3 (75mg/kg) | T4 (350mg/kg) | T5 (700mg/kg) |
| Fase Progestacional | 55,11% | 53,78% | 56,44% | 56,89% | 49,78% | 49,78% |
| Fase Estrogênica | 44,99% | 46,22% | 43,56% | 43,11% | 50,22% | 50,22% |

Resultados expressos em porcentagem. Teste qui-quadrado $p > 0,05$

Na avaliação da atividade estrogênica dos animais utilizando as doses mais elevadas do extrato de *M. nigra*, 350 e 700mg/Kg, não foram encontradas alterações morfológicas, nem da ciclicidade vaginal das ratas do grupo tratado em relação ao grupo controle. Foi observado a presença de ovócitos na tuba uterina nos corte histológicos dos animais tratado 4, caracterizando uma ovulação (Ilustração 9).

Os cortes histológicos dos ovários mostraram a presença de folículos ovarianos em todos os estágios de desenvolvimento e de corpos lúteos. Não houve sinais de edema, folículos císticos ou ovócitos retidos (Ilustração 10), além disso, a altura do epitélio uterino dos animais tratados com o extrato hidroalcoólico nas concentrações de 350 e 700mg/Kg, se apresentou semelhante em relação ao grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7: Altura do epitélio uterino de ratas Wistar controle e tratados com *Morus nigra* L. na concentração de 350mg/Kg e 700mg/Kg durante a fase estrogênica e progestacional.

| Fase | Grupos | | |
|--------------------|--------------|---------------|----------------|
| | Controle | T6 (350mg/Kg) | T7 (700mg/Kg) |
| Estrogênica(μm) | 23,33 ± 1,15 | 23,56 ± 1,64 | 22,88 ± 1,45 |
| Progestacional(μm) | 14,49 ± 1,28 | 14,13 ± 1,29 | 14,76 ± 1,29 |

Resultados expressos em média ± desvio padrão. N =5. p>0.05

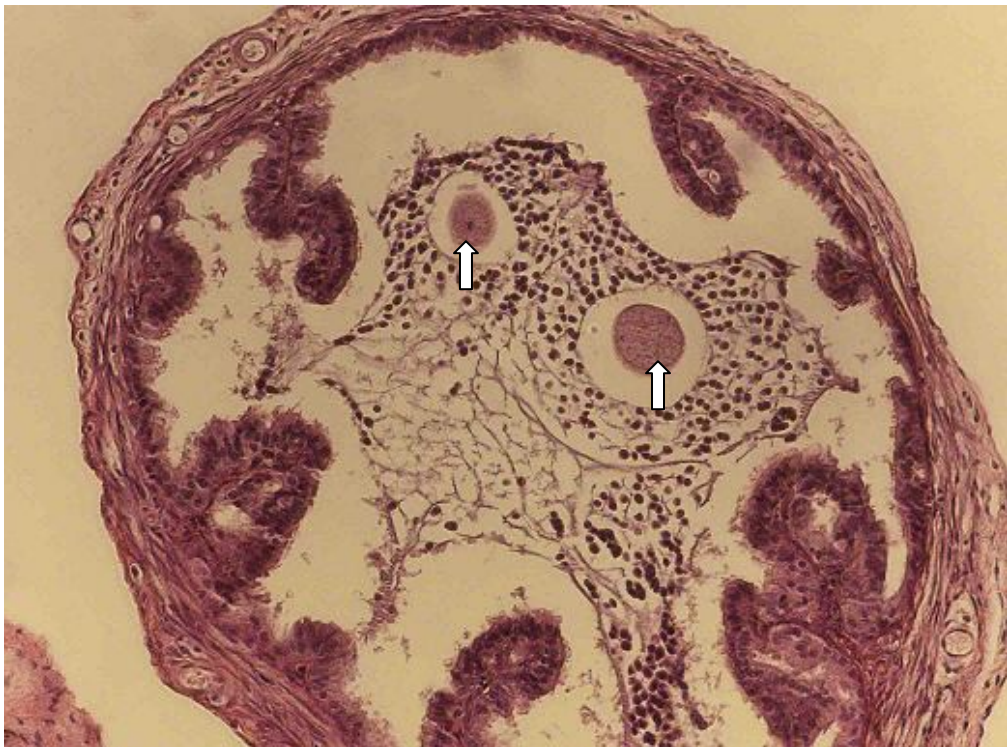


Ilustração 10: Tuba uterina do animal do grupo tratado com o extrato hidroalcoólico de *M. nigra* L. na concentração de 350 mg/Kg (T6) demonstrando a presença de ovócitos (setas). (10x).

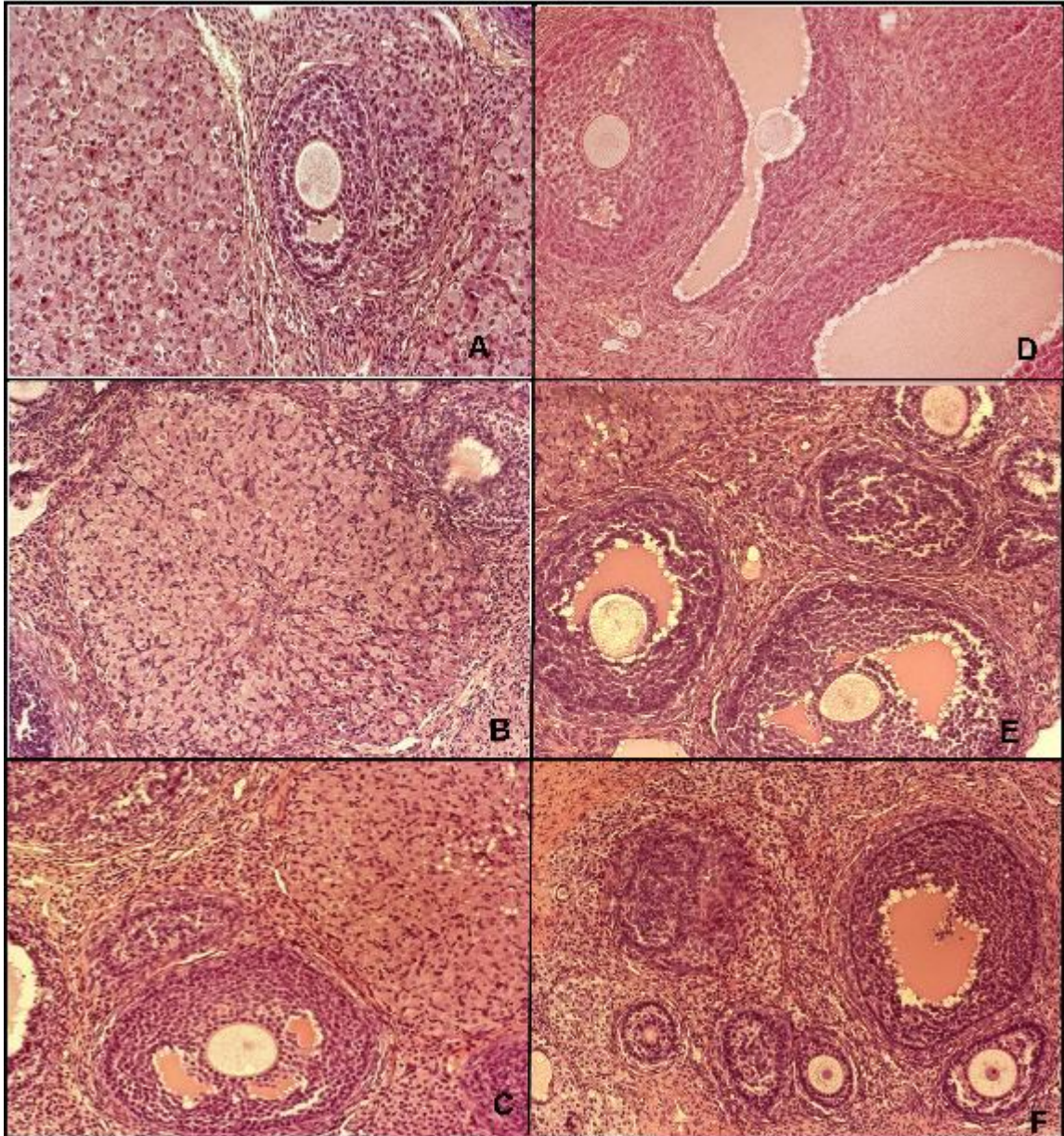


Ilustração 11: Ovário de ratas Wistar durante a fase progesteronal (A, B C) e estrogênica (D, E, F) demonstrando folículos em diferentes fases de desenvolvimento. Animais do grupo controle (A e D) e grupo tratado com extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. 350mg/Kg (B e E) (T6), tratado com extrato hidroalcoólico *Morus nigra* L. 700mg/Kg (C e F) (T7) (10x).

7 DISCUSSÃO

A utilização de plantas medicinais pela população em forma de “chás”, sucos e fitoterápicos com a finalidade de aliviar sintomas e doenças é muito comum, principalmente a partir da crença de que produtos naturais não causam efeitos adversos (MONTANARI e BEVILACQUA, 2002).

Devido às referências de uso popular do chá de folhas de *Morus nigra* no alívio de manifestações de fogacho e de tensão pré-menstrual, seria possível supor que entre os componentes das folhas de *Morus nigra* L. fossem encontradas substâncias capazes de exercer algum efeito estrogênico ou progesterônico e, de fato, a triagem fitoquímica mostrou a presença de taninos, flavonóides, triterpenos/esteróides, polifenóis e cumarinas. Sabidamente flavonóides e triterpenos podem ter efeito semelhante ao estrogênio (IBARRETA *et al.*, 2001; JEFFERSON, 2003), o que poderia justificar o uso popular

A função reprodutiva da fêmea foi avaliada através da citologia vaginal, análise histológica de ovários e histomorfometria do útero. Ciclos em que a alternância entre as fases não siga a sequência proestro, estro, metaestro e diestro são considerados irregulares ou anormais (MARCONDES *et al.*, 2002), cornificação vaginal persistente, com conseqüente aumento na duração do ciclo estral, diestro ou estro prolongado, podem ser indicativo de bloqueio da ovulação (EPA, 1996; GOLDMAN *et al.*, 2007).

Utilizando as doses mais elevadas do extrato, não foram encontradas alterações morfológicas nem da ciclicidade vaginal das ratas, inclusive observou-se ovulação no grupo tratado 4, conforme pode ser evidenciado pela presença de dois ovócitos na tuba uterina (Ilustração 9). Substâncias químicas podem atrasar ou impedir a ovulação pela desregulação ovulatória do hormônio luteinizante (LH), ou por interferir com a capacidade da maturação folicular (OECD, 1998). Não foram observadas diferenças significativas na morfologia geral dos ovários, que exibiam folículos em diversas fases do desenvolvimento, assim como não ocorreu alteração na morfologia e espessura do epitélio uterino. Dessa forma, sob o ponto de vista da metodologia empregada no presente trabalho o extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* não parece ter efeito semelhante aos hormônios ovarianos.

Em mamíferos, a fisiologia materna normal é indispensável para o desenvolvimento normal do feto e da prole (CHAHOUUD *et al.*, 1999), dessa forma a avaliação do peso corporal materno, peso dos órgãos e o consumo de alimento são dados considerados importantes para a avaliação das condições maternas. Além disso, sinais físicos que indiquem estresse materno

como pelos eriçados, diarreia, sialorréia, pouca deambulação nas gaiolas e outros, podem acarretar alterações de cortisona e afetar o desenvolvimento embrionário (CHRISTIAN, 2001; HOOD e MILLER, 2006; CHERNOFF *et al.*, 2008). Nenhum desses indícios foi observado entre os animais dos grupos experimentais, indicando a provável ausência de toxicidade do EHMn, observável pelos indícios clínicos e morfológicos.

Os sinais de toxicidade também podem se expressar por alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas. O tratamento com o extrato de *M. nigra*, de uma forma geral, não induziu modificações no perfil hematológico e bioquímico das ratas. Contudo, foram registrados aumentos pontuais, porém significativos para a enzima ALT nos animais do grupo tratado 5. A enzima ALT é um importante marcador da função hepática, estando alterada em casos de lesões hepáticas (VIJAYALAKSHMI *et al.*, 2000). A alteração dos níveis de ALT pode ser justificada pelo fato desta enzima, que é essencialmente citoplasmática, ser rapidamente liberada para a corrente sanguínea após a lesão hepática, tornando-a um sensível marcador de lesão celular (AL-HABORI *et al.*, 2002; NAOUM, 2009). Assim, o aumento significativo nos níveis de ALT, apenas no grupo T5, sugere uma possível ação hepatotóxica dos componentes do extrato de *Morus nigra*. Born *et al.* (2000) relata que as cumarinas apresentam uma ação tóxica para o fígado. Porém, apesar do aumento significativo dos níveis de ALT, não houve alterações significativas na massa relativa e absoluta do fígado dos animais tratados 5, sendo necessário estudos mais detalhados, através de análises histológicas e de outros marcadores bioquímicos para comprovar estes dados.

Testes de toxicidade reprodutiva são realizados a fim de definir os efeitos diretos de uma substância química no organismo de mamíferos e, devido aos processos reprodutivos que envolvem a fertilidade e desenvolvimento embrionário serem de grande complexidade, a exposição a agentes químicos pode exercer efeitos negativos sobre a reprodução (LEMÔNICA, 2001).

Ercisli e Orhan (2007) relatam que a *M. nigra* contém elevado conteúdo de fenóis e de flavonóides nos frutos, este último, relacionado à quercetina. Sabe-se que a quercetina tem afinidade pelos receptores estrogênicos do tipo beta (HAVSTEEN, 2002), que embora existam em todas as células endometriais, predominam nas células do estroma subepitelial e estão comprometidas com a decidualização (LI e DAVIS, 2007). Tendo-se encontrado flavonóides no EHMn poderia ser esperada alteração do processo de decidualização e, conseqüentemente, do desenvolvimento embrionário. Além disso, sabe-se que a alteração do balanço hormonal estrogênio/progesterona pode acarretar alterações no processo de trânsito

tubário do zigoto/embrião, interferindo no momento preciso da implantação no endométrio, o que pode levar a redução do número de embriões/fetos (CROXATTO *et al.*, 1991).

Pelo que pode ser observado, o índice de implantação, que é um indicador do sucesso da implantação do blastocisto no endométrio (TYL e MARR, 2006), foi semelhante em todos os grupos experimentais, o que indica que não deve ter existido modificação nas concentrações hormonais necessárias ao trânsito, desenvolvimento e implantação do blastocisto, o que foi corroborado pelo número semelhante de reabsorções, que são indicativas de falhas no desenvolvimento pós-implantação (KALTER, 1980).

Segundo Chahoud *et al.*, (1999), o crescimento normal dos fetos depende da combinação de fatores imunológicos, nutricionais, vasculares, genéticos, endócrinos e fatores ambientais, sendo que qualquer alteração nestes fatores interrompe o crescimento e desenvolvimento normal do embrião/feto. Como já foi relatado, não foram observadas alterações clínicas indicativas de toxicidade materna, entretanto, o efeito hipoglicemiante atribuído as folhas *M. nigra* (ORYAN *et al.*, 2003) e o relato de atividade antineoplásica conferida aos compostos fenólicos além da habilidade de modificar a expressão gênica (TAPIERO, 2002; NAKAMURA *et al.*, 2003), poderia causar alguma perturbação no desenvolvimento embrionário. Os dados observados mostram que não ocorreram alterações no número de fetos obtidos, na massa corporal de fetos, no peso de placenta e nem quaisquer alterações na morfologia externa, o que sugere ausência de efeitos tóxicos ou teratogênicos durante o desenvolvimento embrionário. Tais dados, entretanto, necessitam de confirmação por estudos mais detalhados sobre a organogênese e fetogênese, além do desenvolvimento pós-natal das crias.

É importante relatar que os flavonóides obtidos no extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* podem estar na forma de heterosídeos e a absorção dos flavonóides glicosilados é baixa no organismo, necessitando de hidrólise prévia para que, na sua forma aglicona, sejam absorvidos (DAY *et al.*, 1998; GEE *et al.*, 1998; GRAEFE *et al.*, 2001). Assim sendo, não se pode descartar que por uma absorção deficiente a interação com os receptores de estrogênio tenha sido insuficiente para causar alterações observáveis, devendo novos estudos ser realizados para esclarecer a questão.

8 CONCLUSÃO

A administração oral do extrato hidroalcolico de *Morus nigra* L., no modelo experimental apresentado, não demonstrou toxicidade reprodutiva e no desenvolvimento embrionário, nem evidenciou atividade estrogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F.; NAGAO, T.; OKABE, H. Antiproliferative constituents in plants 9. Aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. **Biol. Pharm. Bull.** Tokio, v. 25, n.7, p.920-922, jul. 2002.
- ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens and Cancer. **Lancet Oncology**, Finland, v. 3, p. 364-373, dez. 2002.
- AGRA, M. de F.; FREITAS, P. F. de; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. de Farmac.**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 114-140, jan/mar. 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000, revogada pela Resolução-RDC Nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**, publicado no dia 25 de fevereiro de 2000. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 14 jan. 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determinar a publicação do "**GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS**". Diário Oficial da União; Poder Executivo, publicado no dia 18 de março de 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 14 jan. 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 9, de 29 de abril de 2004. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, publicado no dia 30 de abril de 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 15 jan. 2006.
- AL-HABORI, M. et al., Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J Ethnopharmacol**, v. 83, n. 3, p. 209-17, Dec 2002.
- ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMOES, C. M. O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. **Rev. Bras. de Farmac.**, Florianópolis, v. 18, n. 3, p. 455-463, jul/set. 2008.
- ARAMWIT, P.; BANG, N.; SRICHANA, T. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits **Food Rese. Intern.**, Thailand, v. 43, n. 4, p. 1093-1097, jan. 2010.
- ASCHWANDEN, C. **Herbs for health, but how safe are they?** **Bull. W. H. O.**, Geneva, v.79 (7):691-692, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/bulletin> Acesso em: 11 jan. 2008.

AWAD, A. B.; BURR, A. T.; FINK, C. S. Effect of resveratrol and betasitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. **Prostagland. Leukot Essent Fatty Acids**, v. 72, p.219–226, mar. 2005.

BACCHI, E. M. et al. Anti-ulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Plant. Médic.**, Nova York, v. 61, n. 3, p. 204-207, jun.1995.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S. *et al.*, **Farmacologia aplicada à medicina veterinária** 3. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p.691-699, 2002.

BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Antiproliferative activity of several phenolic compounds against melanoma cell lines: relationship between structure and activity. **Canc. Prevent.**, [S.l.], v. 4, p.30-34, 2005.

BHATIA, S. C. e BHATIA, S. K. Diagnosis and treatment of premenstrual dysphoric disorder. **Americ. Family Physic.**, United States v. 66, n. 7, p. 1239-1248, oct. 2002.

BOLZAN, V. C. **Efeito do extrato das folhas da *Morus nigra* sobre a citologia vaginal e níveis plasmáticos de hormônios sexuais femininos em ratas wistar**. 2008. 59f. Dissertação(Mestrado em Ciências Médicas), Universidade Federal de Ciências da Saúde, Porto Alegre, 2008.

BORN, S. L. et al. In vitro kinetics of coumarin 3,4-epoxidation: application to species differences in toxicity and carcinogenicity. **Toxicol. Scienc.**, v. 58, p. 23-31, jul. 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 48 de 16.03.2004. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Diário Oficial da União 18.03.2004a.

BUSSIÈRE, M. C. et al. Do testosterone and human chorionic gonadotropin stimulate steroidogenesis in granulosa cells of preovulatory follicle in mare? **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** , Belo Horizonte, v. 57, n. 1, p. 62-69, feb. 2005.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazil. Journal of Medic. and Biologic. Research**, [S.l.], v. 33, n. 2, p.179 – 189, feb. 2000.

CAMPOS, D. de A. **Efeito gastroprotetor da 3,6-dimetoxi-6'',6''-dimetil-[2'',3'':7,8]-cromenoflavona isolada de *Lonchocarpus araripensis* Bentham em camundongos e possíveis mecanismos**. 2008. 131f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2008.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Ver. Bras. de Plant. Medic.**, Botucatu v. 7, n. 3, p. 97-106, dez. 2005.

CARSON, D. D. et al. Embryo implantation. **Dev. Biol.**, [S.l.], v. 223, n. 2, p. 217-37, jul. 2000.

CASTRO, A. S. **Efeito de *Morus nigra* L. como terapia hormonal em ratas ooforectomizadas.** 2010. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, mar/apr. 2007.

CHAHOU, I. et al. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reprod. Toxicol.**, Nova York, v. 13, n. 5, p. 375-81, set/ou. 1999.

CHEDRAUI, P. et al. Assessing menopausal symptoms among healthy middle aged women with the Menopause Rating Scale. **Maturitas**, [S.l.], v. 57, n. 3, p. 271-8, jul. 2007.

CHERNOFF, N. et al. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the ‘‘no observed adverse effect level.’’ **Reprod. Toxicol.**, [S.l.], v. 25, p.192–202, feb. 2008.

CHRISTIAN, M. S. Test Methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYS, W. **Method of Toxicology**. Philadelphia: Taylor & Francis, p. 1301-81, 2001.

CLAPAUCH, R. et al. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.46, n.6, p.679-695, dez. 2002.

CORNWELL, T.; COHICK, W.; RASKIN, I.. Dietary phytoestrogens and health. **Phytochemistry**, New York, v. 65, n. 8, p. 995-1016, apr. 2004.

CROXATTO, H. et al. Hormonal control of ovum transport through the rat oviduct, **Arch. Biol. Med. Grap.**, [S.l.], v. 24, n. 3, p. 403-410, sept. 1991.

DAT, *et al.*, Cytotoxic prenylated flavonoids from *Morus alba*. **Fitoterapia**, [S.l.], v. 81, n. 8, p. 1224-1227, dec. 2010.

DAY, A. J. et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. **FEBS Lett.**, [S.l.], v. 436, p. 71-75, sept. 1998.

DI STASI, L. C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian tropical Atlantic forest., **Fitoterapia**, [S.l.], v. 73, n.1, p. 69-91, feb. 2002.

DICKERSON, L. M. et al. Premenstrual syndrome, **Americ. Famil. Phisic.**, [S.l.], v.15, p. 1743-1752, apr. 2003.

DUGO, P. et al. Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore highperformance liquid chromatography with electrospray ionization detection. **J. Agric. Food Chem.**, [S.l.], v. 49, p. 3987–3992, aug. 2001.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency), Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. **Federal Register**, 61(212):56274-56322, 1996.

ERCISLI, S. e ORHAN, E.. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemist.**, [S.l.], v. 103, p. 1380–1384, oct. 2007.

FERRO, D. Legislação de Fitoterapia. In: Ferro D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, p. 83-114, 2006.

FRACKIEWICZ, E. J. e SHIOVITZ, T. M. Evaluation and Management of Premenstrual Syndrome and Premenstrual Dysphoric Disorder. **J. Am. Pharm. Assoc.**, [S.l.], v. 41, n. 3, p. 437-447, mai/jun. 2001.

FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E; NEIL, J., **The Physiology of Reproduc.** 2. ed. New York: Raven Press, 1994.

FRIEDRICH, K. **Alteração da expressão do receptor de estrogênio subtipo α relacionada a abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley**. 2003. 122f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Toxicologia, Fundação Oswaldo Cruz, 2003.

FONTELES, M. M. de et al. Vigilância pós-comercialização da Aguardente Alemã® (*Operculina macrocarpa* e *Convolvulus scammonia*). **Rev. Bras. de farmac.**, [S.l.], v. 18, n. 0, p. 748-753, dez. 2008.

FUCK, S. B. et al. Herbal remedies used by residents of the urban areas from city of Bandeirantes, Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 3, p. 291-296, jul/set. 2005.

GALVÃO, L. L. L. F. et al. Prevalência de transtornos mentais comuns e avaliação da qualidade de vida no climatério. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 414-20, sept/oct. 2007.

GEE, J. M. et al. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. **Free Rad. Biol. Med.** United States, v. 25, p.19-25, jul. 1998.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.**, United States, v. 80, n. 2, p. 84-97, apr 2007.

GRAEFE, E. U. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. **J. Clin. Pharmacol.**, [S.l.], v. 41, p. 492-499, may. 2001.

GRUBER, C. J. et al. Production and actions of estrogens. **N. Engl. J. Med.**, [S.l.], v. 346, p.340–352, jan. 2002.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspec. of Medic.**, [S.l.] v. 27, n. 1, p. 1-93, feb. 2006.

GUYTON, A. C.e HALL, J., **Tratado de fisiologia médica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1115, 2008.

HALBE, H. W. **Tratado de ginecologia**. 3ª. ed. São Paulo: Roca, 2000.

HALL, G. e PHILLIPS, T. J. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, United States, v. 53, n. 4, p. 555-68, Oct. 2005.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus*). **Food Sci. Technol. Int.**, United States, v. 13, p.17–25, apr. 2007.

HARPER, M. J. K. Gamete and zygote transport. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Ed.). **The physiology of reproduc.**, 2. ed. New York: Raven Press, p.123-187, 1994.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, nov/dec. 2002.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journ. of Nutrit. Biochemistry**, New York, v. 13, p. 572-584, may. 2002.

HOOD, R. D.; MILLER, D. B. Maternally mediated effects on development. In: HOOD, R. D. **Developmental and reproductive toxicology: a practical approach**. 2nd ed. London: Taylor & Francis. P. 93–124, 2006.

ICH - International Conference on Harmonization, Department of Health and Human Services, **Guideline on Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & toxicity to male fertility S5(R2)**, 2005.

IBARRETA, D.; DAXENBERGER, A.; MEYER, H. H. D. Possible health impact of phytoestrogens and xenoestrogens in food. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 109, n. 3, p. 161-84, mar. 2001.

JEFFERSON, A. Dietary phytoestrogens – a role in women’s health. **Nutrit. and Food Science**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 16-22, feb. 2003.

JIN, F. et al. Structural Requirements of 2',4',6'-Tris(methoxymethoxy) chalcone Derivatives for Anti135 inflammatory Activity: The Importance of a 2'-Hydroxy Moiety. **Arch. Pharm. Res. Korea**, v. 30, p.1359-136, nov. 2007.

JORDAN, V. C. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 1. receptor interactions. **J. Med. Chem., [S.l.]**, v. 46,p.883-908, mar. 2003.

JUNQUEIRA, L. C. U. e CARNEIRO, J., **Histologia Básica**, 10^a ed, Guanabara, pp. 488, 2004.

KALE, A.; GAWANDE, S.; KOTWAL, S. Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the Cellular level. **Phytother. Res.**, England, v. 22, p. 567-577, mai. 2008.

KALTER, H. The relationship between congenital malformations and prenatal mortality in experimental animals. In: Potter I.(ed), Hook EB. **Human embryo. and fetal deat**. New York: Academic Press, p.29-44, 1980.

KESHRI, G; LAKSHMI, V; SINGH, M. M. Pregnancy interceptive activity of *Melia azedarach* Linn. in adult female Sprague-Dawley rats. **Contraception**, [S.l.], v. 68, p.303-306, oct. 2003.

KIM, H. G. et al. Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. **British Journ. of Nutrit.**, Cambridge, v. 104, n. 1, p. 8–16, feb. 2010.

KOYUNCU, F. Organic acid composition of native black mulberry fruit. **Chem. Nat. Compd.**, [S.l.], v. 40, n. 4, p. 367–369, jul. 2004.

KURZER, M. S. e XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Rev. of Nutrition**, United States, v. 17, n. 1, p. 353-81, jul. 1997.

LANINI, J. et. al. "Natural and therefore free of risks" - adverse effects, poisonings and other problems related to medicinal herbs by "raizeiros" in Diadema/SP. **Rev. Bras. de Farmacogn.**, João Pessoa, v. 19, n. 1, p. 121-129, jan/mar. 2009.

LEE, K. Y. e DEMAYO, F. J. Animal models of implantation. **Reproduction**, England, v. 128, n. 6, p. 679-95, dec. 2004.

LEITÃO, F. et al. Urban ethnobotany in Petrópolis and Nova Friburgo (Rio de Janeiro, Brazil). **Rev. Bras. de farmac.** João Pessoa, v. 19, n. 1, p. 333-342, jan/mar. 2009.

LEMÔNICA, I. P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M.T.V.; SCHÜLER-FACCINI, **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/ UFRGS, p. 19 – 39, 2001.

LI, S. e DAVIS, B. Evaluating Rodent Vaginal and Uterine Histology in Toxicity Studies. **Birth Defects Researc.**, [S.l.], v. 80, p. 246-252, jun. 2007.

LIN, J. e TANG, C. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation, **Food Chemist.**, [S.l.], v. 101, p. 140–147, aug. 2007

LONG, J. A. e EVANS, H. M. The oestrous cycle in the rat and other studies in the physiology of reproduction. **Anatomical Record**, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 31-40, 1920.

MACHADO, L. H. B. Entering the representations of the trade in medicinal plants Goiânia/GO: a reflection geographical. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 159-172, abr. 2009.

MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonóids – a review. **Biomed Pharmac.**, [S.l.], v.56, p.296-301, aug. 2002.

MARCONDES, F. K.; BIANCH, I. F. J.; TANNO, A. P. Determination of the Estrous Cycle phases of Rats: Some Helpful Considerations. **Braz. Journ. of Biology**, São Carlos, v. 62, n. 4, p. 609-614, nov. 2002.

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: UFC, 128 pp., 1997.

MATURANA, M. A.; IRIGOYEN, M. C.; SPRITZER, P. M. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concept. **Clinics**, Sao Paulo, v. 62, n. 1, p. 77-86, feb. 2007.

MENSE, S. M. et al. Phytoestrogens and breast câncer prevention: possible mechanisms of action. **Environm. Health Perspectiv.**, Durham-United States, v. 116, n. 4, p. 426-33, apr. 2008.

MIKSICEK, R. J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. **Mol. Pharmacol.**, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 37-43, jul. 1993.

MIRANDA, M. A. et al. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 36, n. 1, p. 61-68, jan/mar. 2010.

MONTANARI, T. e BEVILACQUA, E.. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, United States, v. 65, n. 2, p. 171-5, feb. 2002.

MOON, Y. J., WANG, X., MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicol. In Vitro**, [S.l.], v. 20, n. 2, p. 187–210, mar. 2006.

MOORE, K. L., **Embriologia Clínica**, 8ª ed, Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 536, 2008.

NADERI, A. G. *et al.* Antioxidant Activity of Three Extracts of *Morus nigra*. **Phytother. research**, [S.l.], v. 18, n. 5, p. 365–369, may. 2004.

NAKAMURA, Y. *et al.* Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **J. Agric. Food Chem.**, [S.l.], v. 51, n. 11, p. 3309-3312, apr. 2003.

NAOUM, P. C. **Doenças que alteram os exames bioquímicos**. 1^a ed, Atheneu, São Paulo, pp. 149, 2009.

NILSSON, S. e GUSTAFSSON, J. Biological role of estrogen and estrogen receptors. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, [S.l.], v.37, p.1–28, 2002.

OECD. The Validation of Test Methods Considered for Adoption as OECD Test Guidelines. **ENV/MC/CHEM (98) 6**. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 1998.

OLIVEIRA, M. C. C. de *et al.* Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan. **Química Nov.**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 182-184, mar/abr. 1999.

OMS- Organización Mundial de la Salud. **Investigaciones sobre la menopausia en los años noventa**. Genebra: Organización Mundial de la Salud., Série de Informes Técnicos, 866, 2000.

ORYAN, S. *et al.* Hypoglycaemic effect of alcoholic extract of *Morus nigra* L. leaves in normal and diabetic rats. **J. of Medical Plants**, [S.l.], v.2, p. 27-32, jun. 2003.

OSBORNE, C. Kent; SCHIFF, R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. **J. Clin. Oncol.**, v.23, p.1616-1622, mar.2005.

PADILHA, M. M. *et al.*, Antiinflammatory Properties of *Morus nigra* Leaves. **Phytotherapy research.**, [S.l.], v. 24, p. 1496–1500, oct. 2010.

PARIA, B. C.; SONG, H.; DEY, S. K. Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. **Int. J. Dev. Biol.**, Spain, v. 45, n. 3, p. 597-605, jun. 2001.

PARKER, R. M. Testing for reproductive toxicity. In: HOOD, R. D. (Ed). **Developmental and reproductive toxicology - a practical approach**. Londres: Taylor and Francis, pp.525-587, 2006.

PAWLOWSKA, A. M.; OLESZEK, W.; BRACA, A. Quali-quantitative Analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) Fruits. **J. Agric. Food Chem.**, [S.l.] v. 56, n. 9, p. 3377–3380, apr. 2008.

PEDRO, A. O. *et al.* Síndrome do climatério: inquérito populacional domiciliar em Campinas, SP. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, vol.37, n.6, pp. 735-742, dez. 2003.

PETLEVSKI, R. et al. Effect of 'antidiabetis' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. **J. Ethnopharmacol.**, Ireland, v. 75, n. 2-3, p. 181-4, may. 2001.

PETTERSSON, K. e GUSTAFSSON, J. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. **Annual Rev. of Physiol.**, Palo Alto, v. 63, p. 165-92, mar. 2001.

QUINTIN, J. et al. Synthesis and biological evaluation of a series of tangeretin-derived chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett.**, England, v.9, 167-169, jan. 2009.

REIBER, C. An evolutionary model of premenstrual syndrome. **Medic. Hypotheses**, [S.l.], v. 70, n. 5, p. 1058-1065, nov. 2007.

REZENDE, H. A. de e COCCO, M. I. M. The phytoterapy utilization in the rural population routine. **Rev. da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 282-288, sep. 2002.

RODRIGUES, I. C. e OLIVEIRA, E. de. Prevalence and sociability of women with premenstrual syndrome. **Arq. Ciênc. Saúde**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 146-152, jul/set. 2006.

RUSAK, G.; GUTZEIT, H. O.; MILLER, J. L. Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells. **Nutrit. Research**. [S.l.], v. 25, p.141-153, feb. 2005.

SAKAGAMI, H. et al. Anti-stress activity of mulberry juice in mice. **In Vivo**, Greece, v. 20, n. 4, p. 499-504, jul/aug. 2006.

SANTOS, K. R. P. et al. Influência da ausência de luz sobre o ciclo estral de ratas. **Arq. Inst. Biol.**, Sao Paulo, v. 70, p. 21-23, jan/mar. 2003.

SILVA, M. I. G. et al. The use of herbal medicines in the family health care units in Maracanaú (CE). **Rev. Bras. de Farmac.**, [S.l.], v. 16, n. 4, p. 455-462, out/dez. 2006.

SILVA, I. O. et al. Avaliação do potencial estrogênico de *Morus* sp em ratas Wistar. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 22, p. 49-57, 2003.

SCHMIDT, P. J. et al. Differential behavioral effects of gonadal steroids in women with and in those without premenstrual syndrome. **The New England Journ. of Medic.**, Massachusetts, v. 338, n. 4, p. 209-216, jan. 1998.

SHIRAI, T. Diet and prostate câncer. **Toxicology**, [S.l.], v. 181-182, p. 89-94, dez. 2002.

SILVEIRA, P. F. da; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Pharmacovigilance and adverse reactions to the medicinal plants and herbal drugs: a reality. **Braz. Journ. of Pharmacognosy**, [S.l.], v. 18, n. 4, p. 618-626, out/dez. 2008.

SKIBOLA, C. F. e SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology & Medic.**, New York, v. 29, n. 3-4, p. 375-83, aug. 2000.

SMITH, S. K. Regulation of angiogenesis in the endometrium. **Trends in Endocrinol. & Metabol.**, United States, v. 12, n. 4, p. 147 – 151, mai/jun. 2001.

SOARES, C. N.; PROUTY, J.; POITRAS, J. Occurrence and treatment of depression by sex hormones. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, Sao Paulo, v. 24, n. 1, p. 19-23, apr. 2002.

SONG, W. et al. Phytochemical profiles of different mulberry (*morus sp.*) species from china. **J. Agric. Food Chem.**, United States, v. 57, p. 9133–9140, oct. 2009.

SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D.; DRAVID, A. A. Estrous Stage Determination in Rats by Means of Scanning Electron Microscopic Images of Uterine Surface Epithelium. **The anat. record.**, [S.l.], v. 254, p. 116-126, jan. 1999.

STOCKARD, C. e PAPANICOLAU, G. N. P. The existence of a typical oestrous cycle in the guinea pig with a study of its histological and physiological changes. **Americ. Journ. of Anatomy**, [S.l.], v. 22, n. 225-284, set. 1917.

TAPIERO, H. et al. Do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomed. Pharmacother.**, [S.l.], v. 56, p.200-207, jun. 2002.

TEIXEIRA, Á. A. C. et al. Morphologic aspects of the endometrium, in the estrus phase, of pinealectomized rats. **Rev. Chilena Anatom.**, Temuco, v. 20, n. 2, p. 145-149, 2002.

TUROLLA, M. S. dos R. e NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 289 -306, abr/jun. 2006.

TYL, R. W. e MARR, M.C. Development toxicity testing – Methodology. 2005. In: HOOD, R. D. (ed.). **Developmental and reproductive toxicology - a practical approach**. 2nd. ed. Londres: Taylor & Francis, p. 201-61, 2006.

VALADARES, G. C. Premenstrual dysphoric disorder review – concept, history, epidemiology and etiology. **Rev. Psiquiatr. Clín.**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 117-123, 2006.

VANONI, A. P. N. B. **Avaliação da atividade fitoestrogenica do extrato hidoralcoolico e da infusão das folhas de *Morus nigra L.*** 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

VEIGA-JUNIOR, V. F. e MELLO, J. C. As monografias sobre plantas medicinais. **Rev. Brasil. de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 464-471, jul/sept. 2008.

VIEIRA, S. C. H. et al. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Brazil. Journ. of Pharmacognosy**, [S.l], v. 20, n. 1, p. 28-34, jan/mar. 2010 apud WAGNER, H. e WISENAUER, M. **Fitoterapia: Fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas**. 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

VIGETA, S. M. G. e BRETÃS, A. C. P. Peri-menopausal and post-menopausal experience among women with and without hormone replacement therapy. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 6, p. 1682-1689, nov/dez. 2004.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **J. Ethnopharmacol.**, Ireland, v. 69, n. 1, p. 9-15, jan. 2000.

VINIJSAMUN, A. et al. Effects of a monoclonal antibody against progesterone on embryo transport, development and implantation in laboratory mice. **Reprod. Fertil. Develop.**, [S.l], v. 2, n. 4, p. 395-405, 1990.

WASANO, N. et al. A unique latex protein, MLX56, defends mulberry trees from insects. **Phytochemistry**, [S.l], v. 70 n. 7, p. 880–888, may. 2009.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Ed.). **The physiol. of reproduction**, v. 1. New York: Raven Press; 1994.; p. 189–317.

YANG, C. S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, **Annu. Rev. Nutr.** [S.l], v.21, p. 381–406, jul. 2001.

ZUANAZZI, J. A. S.; Flavonóides In: SIMÕES, C; SCHENKEL, E; GOSMANN, G; MELLO, J; MENTZ, L; PETROVICK, P. **Farmacognosia** da planta ao medicamento. 2ª ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, PP. 489-516, 2000.

10 APÊNDICE

Artigo a ser publicado:

Extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L.: avaliação da atividade na reprodução de ratas Wistar (*Rattus norvegicus* BERKENHOUT, 1769)

Graziela Tonioni de Queiroz ¹ Tatianne Rosa Santos ² Renato Macedo ³ Vera Maria Peters ⁴ Magda Narciso Leite ⁵ Rita de Cássia de Silveira e Sá ⁶ Martha de Oliveira Guerra ⁷

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração em Comportamento e Biologia Animal/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil grazielaufjf@yahoo.com.br

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração em Comportamento e Biologia Animal/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil tatiannersantos@yahoo.com.br

³ Centro de Biologia da Reprodução/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil renatimdalapa@yahoo.com.br

⁴ Centro de Biologia da Reprodução/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil; Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração em Comportamento e Biologia Animal/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil peters.vera@ufjf.edu.br

⁵ Departamento de Farmácia e Bioquímica /Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil magda.narciso@hotmail.com

⁶ Departamento de Fisiologia e Patologia/Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, CEP 58059-900, Brasil ritacassia.sa@bol.com.br

⁷ Centro de Biologia da Reprodução/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil; Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração em Comportamento e Biologia Animal/Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36036 – 330, Brasil martha.guerra@ufjf.edu.br

Resumo:

Morus nigra L., conhecida como amoreira, é utilizada na substituição da terapêutica da reposição hormonal convencional e também para aliviar sintomas da tensão pré-menstrual. A espécie apresenta elevada concentração de fenóis, flavonóides e antocianinas em seus frutos além de terpenóides e esteróides nas folhas. Nenhum estudo relacionado à atividade estrogênica em animais inteiros, sobre toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento embrionário foi encontrado, sendo este o objetivo desse trabalho. Os animais foram distribuídos nos grupos controle e tratados com 25, 50 75, 350 e 700mg/Kg do extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. (EHMn), por gavagem. O tratamento ocorreu durante 15 dias consecutivos, mantendo-se durante o acasalamento e até o 14^o dia de gestação. Esfregaço vaginal foi realizado diariamente. A massa corporal das fêmeas foi anotada a cada cinco dias. No 15^o dia de gestação, as fêmeas foram eutanasiadas e rins, fígado, baço e ovários foram removidos e pesados. Foram contados: implantes, reabsorções, fetos vivos e mortos. Obteve-se a massa corporal de fetos e peso de placentas. Através de cortes histológicos dos ovários e

mensuração da altura do epitélio uterino foi avaliada a atividade estrogênica. Não foram encontradas diferenças significativas nas variáveis estudadas, concluindo-se que o EHMn no modelo experimental apresentado, não demonstrou toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento embrionário, nem evidenciou atividade estrogênica

Palavras chave: *Morus nigra* L., toxicologia, reprodução, ratas Wistar

1. Introdução

Morus nigra L. (Moraceae), conhecida como amoreira, amora preta ou negra (ERCISLI e ORHAN, 2007; WASANO *et al.*, 2009), é encontrada em diferentes regiões do Brasil e se destaca por suas atividades medicinais. Frutos, folhas, cascas e raízes são utilizados como laxante, sedativo, expectorante, refrescante, emoliente, calmante, diurético, hipoglicemiante, anti-séptico, antiinflamatório, antioxidante, no tratamento de eczema, inflamação bucal e analgésico em dor de dente, (ERCISLI e ORHAN, 2007). As folhas de *Morus* sp. são usadas na China como antioxidante, antimicrobiano e antiinflamatório (SONG *et al.*, 2009), sendo que as de *Morus alba* L. possuem atividade citotóxica em células neoplásicas (DAT *et al.*, 2010). Padilha *et al.*, (2010) demonstraram que as folhas de *Morus nigra* apresentam atividade antiinflamatória, hipoglicemiante (ORYAN *et al.*, 2003; ERCISLI e ORHAN, 2007), além de ter atividade antioxidante (NADERI *et al.*, 2004).

As folhas de *Morus nigra* têm sido utilizadas popularmente por mulheres no climatério, na substituição da terapêutica da reposição hormonal convencional, com efeito semelhante ao obtido com o uso de estrogênio (SILVA *et al.*, 2003; MIRANDA *et al.*, 2010) e também para aliviar sintomas da tensão pré-menstrual. No climatério o uso do preparado denominado popularmente de “chá” - decocto ou infusão das folhas - melhora os sintomas da menopausa (MIRANDA *et al.*, 2010), particularmente os fogachos (CASTRO, 2010) que são relacionados à vasodilatação súbita que leva ao calor e rubor da pele, em especial do rosto.

Estudos experimentais, entretanto, são controversos quanto aos testes usados para verificar efeito estrogênico em modelos animais ooforectomizados e púberes (VANONI, 2006; BOLZAN, 2008; CASTRO, 2010), porém Silva *et al.*, (2003), avaliando a atividade estrogênica da infusão das folhas de *Morus* sp. em ratas ooforectomizadas, não encontrou efeito estrogênico.

Entre os componentes ativos de espécies do gênero *Morus* sp. foram identificados: ácidos graxos, vitamina C, pertencentes ao metabolismo primário das plantas, além de

fenilflavonoide (morusina), (PETLEVSKI *et al.*, 2001); flavonóides (NADERI *et al.*, 2004; LIN e TANG, 2007; ERCISLI e ORHAN, 2007; PAWLOWSKA *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2009), compostos fenólicos (ERCISLI e ORHAN, 2007; SONG *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010), ácidos orgânicos (KOYUNCU, 2004), antocianinas, carotenóides (DUGO *et al.*, 2001, HASSIMOTTO *et al.*, 2007), alcalóides (SONG *et al.*, 2009), substâncias resultantes do metabolismo secundário das plantas. Especificamente em *Morus nigra* foi detectada elevada concentração de fenóis e flavonóides em seus frutos (ERCISLI e ORHAN, 2007) além de quatro tipos de antocianinas (PAWLOWSKA *et al.*, 2008), enquanto que nas folhas foi identificado à presença terpenóides e esteróides, β -sitosterol (PADILHA *et al.*, 2010).

Nos componentes detectados na espécie já foram descritas atividades farmacológicas tais como: anticarcinogenicidade atribuída à substâncias fenólicas e ao esteróide β -sitosterol, (TAPIERO *et al.*, 2002; NAKAMURA *et al.*, 2003; AWAD *et al.*, 2005) e a habilidade para modificar a expressão gênica (TAPIERO, 2002; NAKAMURA *et al.*, 2003). Alguns flavonóides têm atividade estrogênica demonstrada (OLIVEIRA *et al.* 1999) como a quercetina, com ampla aplicação farmacológica. As antocianinas inibem a Cox-1 e Cox -2 enzimas envolvidas com a síntese de prostaglandinas (SEERAM *et al.*, 2001).

Foram encontrados estudos relacionados ao possível potencial estrogênico das folhas de *Morus nigra* em ratas Wistar púberes (VANONI, 2006) e ooforectomizadas (SILVA *et al.*, 2003; VANONI, 2006) e tratamento crônico durante 18 semanas em ratas ooforectomizadas (CASTRO, 2010).

As atividades mencionadas - anticarcinogenicidade, modificação de expressão gênica, interferência com produção de prostaglandinas e indução de apoptose - e os fitoestrogênios, embora exerçam função importante, podem alterar o processo reprodutivo seja interferindo com a síntese de hormônios ovarianos e a ciclicidade vaginal (fitoestrogênios); com a proliferação celular do embrião (anticarcinogenicidade), com os mecanismos envolvidos na expressão gênica durante todo o desenvolvimento e diferenciação do embrião ou com a produção de prostaglandinas α ou E, que estão relacionadas com diversos mecanismos reprodutivos, entre eles a ovulação (PGF2- α) e a implantação do blastocisto (PGE).

Não foram encontrados na literatura consultada estudos relacionados a atividade estrogênica das folhas de *Morus nigra* em fêmeas adultas, à toxicidade reprodutiva e a do desenvolvimento embrionário, sendo este o objetivo desse trabalho.

2. Material e métodos

A metodologia deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo número 048/2009-CEEA, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil), que segue os princípios internacionais de ética na experimentação animal.

2.1. Preparo do material vegetal

As folhas de *Morus nigra* L. foram coletadas no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em Juiz de Fora/MG no mês de novembro de 2009. A planta foi identificada pelo Prof. Luiz Menine Neto no herbário Professor Leopoldo Krieger, onde a exsicata encontra-se depositada sob o número CESJ 48362.

O extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. (EHMn) foi preparado no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF. Foram tomadas 50 g das folhas de *Morus nigra* seca, trituradas e levadas à extração com etanol 70% em aparelho de Soxhlet até o esgotamento total da droga. O extrato obtido foi rotaevaporado até eliminação completa do etanol, sendo a solução obtida filtrada em algodão para a eliminação completa da clorofila. A solução final alcançada foi utilizada para produzir os extratos nas concentrações desejadas.

Para os extratos de concentração 25, 50 e 75mg/Kg, foi utilizado a solução cuja concentração final foi de 16mg/mL. Na concentração de 350mg/Kg, a concentração da solução final foi de 50mg/mL e na concentração de 700mg/Kg, a solução final apresentou concentração de 106mg/mL.

2.2. Triagem fitoquímica

A análise fitoquímica das folhas de *Morus nigra* L. foi realizada, segundo Matos (1997), a fim de verificar a presença das seguintes classes de produtos do metabolismo

secundário através de reações de identificação: flavonóides, taninos, cumarinas, heterosídeos, triterpenos/esteróides, saponinas, alcalóides e antraquinonas.

2.3. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar nulíparas adultas, com dois meses de idade, pesando entre 120-170 g, obtidas na colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (Universidade Federal de Juiz de Fora), alojadas em gaiolas de polipropileno, cobertas com camas de maravalha selecionada (não esterilizada), dotadas de cocho para ração do tipo peletizada e local para mamadeira com água filtrada. As gaiolas foram mantidas em armários climatizados (Alesco, Brasil), localizados em alojamento com temperatura ($22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) e umidade relativa do ar (40-60%) e regime de luz de 12 h claro/12 h escuro. Os animais receberam 25 g de ração comercial (Nuvilab) por dia e água *ad libitum*.

2.4. Desenho experimental – Toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento embrionário

Foi seguido o protocolo do International Comite for Harmonization – estágio I, (ICH, 2005) com pequenas modificações, descritas adiante.

Noventa animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos de quinze ratas cada, compreendendo: [1] T1(EHMn 25mg/Kg); [2] T2(EHMn 50 mg/Kg); [3] T3 (EHMn 75mg/Kg); [4] T4(EHMn 350 mg/Kg); [5] T5(EHMn 700mg/Kg); [6] Controle (água destilada). A dose de 700mg/kg foi baseada naquela utilizado por VANONI (2006) e as demais doses foram a intervalos decrescentes desta concentração.

Após 15 dias de tratamento com o EHMn, administrado diariamente por via intragástrica, as ratas foram acasaladas com machos de fertilidade comprovada (2 fêmeas: 1 macho), mantendo os tratamentos até o 14^o dia pós-inseminação. Foi considerado o primeiro dia pós-inseminação aquele em que se determinou a presença de espermatozóides no esfregaço vaginal (KESHRI *et al.*, 2003), realizado todos os dias, às 8 horas da manhã, desde o início do tratamento.

Durante 60 minutos após o tratamento e, posteriormente, uma vez ao dia as fêmeas foram observadas para identificação de indícios clínicos de toxicidade (pêlos eriçados, estereotípias, hiper ou hipo-atividade no interior da gaiola, diarreia, sialorréia, poliúria ou morte, segundo Christian, (2001).

A estimativa do consumo de ração foi feita pela diferença de peso da ração colocada em um dia (25g) e a sobra obtida no dia seguinte e a massa corporal de cada animal foi obtida no início do tratamento e, posteriormente, de cinco em cinco dias até a data da eutanásia.

No 15^o dia de gestação os animais foram eutanasiados por exsanguinação, mediante punção cardíaca, realizada sob anestesia com Ketamina 2% (10mg/Kg) e Xilasina 5% (90mg/Kg) por via intraperitoneal. Após a laparotomia, trato reprodutor feminino, fígado, rins e baço foram removidos e os três últimos pesados em balança de precisão. Os ovários foram pesados e tiveram os corpos lúteos contados sob microscópio estereoscópico. Os cornos uterinos foram seccionados longitudinalmente para contagem de fetos vivos (batimento cardíaco presente) e mortos. Os fetos e placentas foram pesados, obtendo-se o peso médio da ninhada bem como o peso médio da placenta. Posteriormente, os fetos foram fixados em Bouin por 60 minutos e observados em microscópio estereoscópico para identificação de alterações de membros superiores e inferiores, morfologia da face e verificação do fechamento do tubo neural.

Total de fetos vivos, de corpos lúteos, número de reabsorções e total de implantes foram determinados para cálculo das taxas de implantes por grupo (total de implantes / total de corpos lúteos) x 100; de perdas pré-implantação por grupo (100 – taxa de implantação), e de perdas pós-implantação por grupo [(total de reabsorções + total de fetos mortos) / total de implantes] x 100 (PARKER, 2006).

2.5. Avaliação de efeito estrogênico

Para avaliar o efeito estrogênico quinze animais foram distribuídos aleatoriamente em um grupo controle (n =5) e dois grupos tratados com o EHMn nas concentrações de (T6) 350 (n=5) e (T7) 700 mg/kg (n=5), durante 15 dias consecutivos, determinando-se a ciclicidade através da citologia vaginal, obtida por esfregaço vaginal realizado diariamente às 8 horas da manhã. No 16^o dia os animais foram eutanasiados por exsanguinação, mediante punção cardíaca, realizada sob anestesia com Ketamina 2% (10mg/Kg) e Xilasina 5% (90mg/Kg) por

via intraperitoneal. Ovários e útero foram removidos e fixados em formol cálcio de Baker, incluídos em parafina, seccionados a 5 μ m e os cortes, coradas com Hematoxilina-Eosina. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico para avaliação da morfologia uterina e do ovário. Foram feitas capturas de imagens usando microscópio de luz acoplado a uma câmera de vídeo (AxioCam IcC3, Carl Zeiss, Jena Alemanha). Em cortes transversais do útero foi medida a espessura do epitélio, utilizando o software de análise de imagem (AxioVision 4.7 REL Carl Zeiss, Jena, Alemanha) (FIGURA 1). Foram feitas 8 medições em cada corte histológico por grupo.

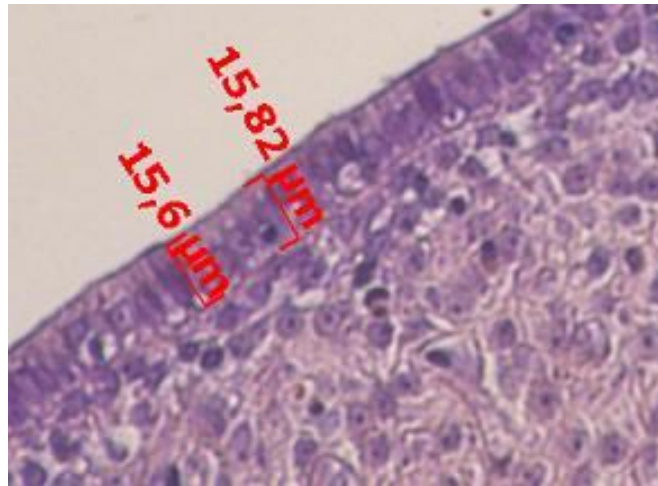


Figura 1: Corte histológico do útero de rata demonstrando a mensuração da altura do epitélio.

2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do teste ANOVA, seguido do teste de Dunnett. Para dados não homocedásticos e sem distribuição normal foi usado teste Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney, $\alpha = 0,05$.

3. Resultados

a) Triagem fitoquímica

Na avaliação fitoquímica das folhas de *Morus nigra* L. foi possível detectar a presença de taninos, flavonóides, triterpenos/esteróides e cumarinas.

b) Toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento embrionário

Durante todo o experimento não foi verificada a ocorrência de mortes e nem detectados sinais de toxicidade nos grupos experimentais estudados. A estimativa de consumo de ração (GRÁFICO 1) assim como o ganho de peso corporal (GRÁFICO 2) se mostrou semelhante entre todos os animais dos grupos tratado e controle.

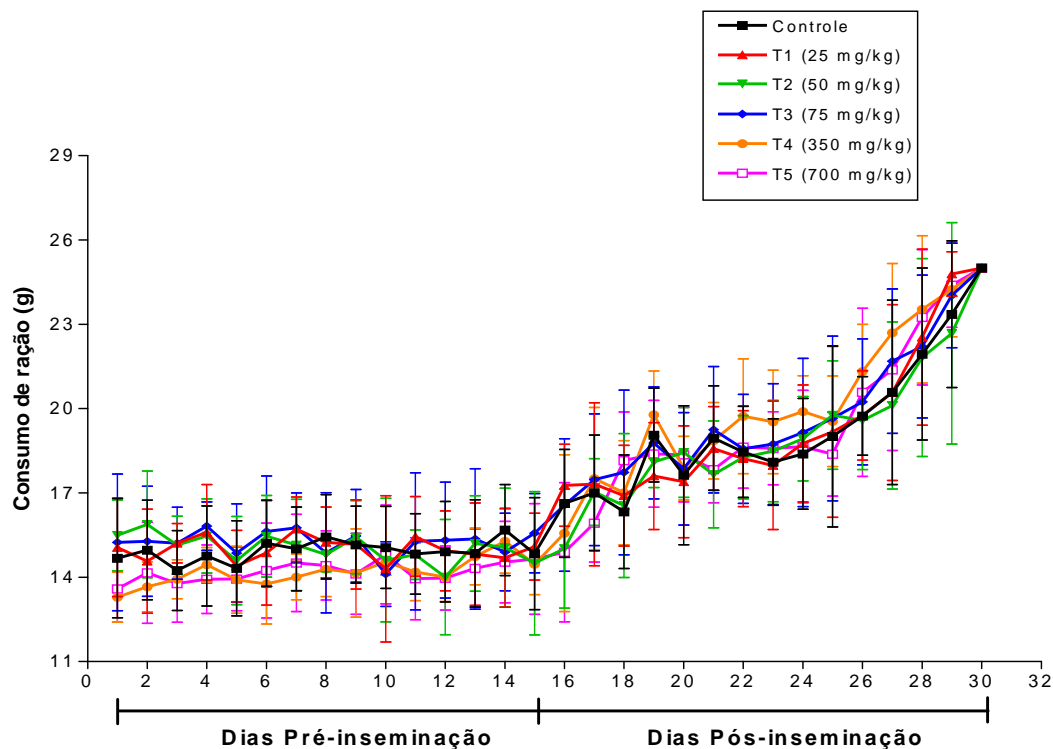


Gráfico 1: Consumo de ração de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação (1-15^o dia) com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o, N=15.

A avaliação da citologia vaginal através dos esfregaços vaginais apresentou-se semelhante entre os grupos experimentais (dados não apresentados).

Os cortes histológicos dos ovários mostraram a presença de folículos ovarianos em todos os estágios de desenvolvimento e de corpos lúteos. Não houve sinais de edema, folículos císticos ou ovócitos retidos (Figura 2). A altura do epitélio uterino dos animais tratados não apresentou alterações significativas quando comparadas com o grupo controle: fase estrogênica (C= $23,33 \pm 1,15 \mu\text{m}$; T6= $23,56 \pm 1,64 \mu\text{m}$; T7= $22,88 \pm 1,45 \mu\text{m}$); fase progesterônica (C= $14,49 \pm 1,28 \mu\text{m}$; T6= $14,13 \pm 1,29 \mu\text{m}$; T7= $14,76 \pm 1,29 \mu\text{m}$).

A Tabela 1 apresenta os dados do peso absoluto e relativo de fígado, rins, baço e ovários, enquanto que o total de corpos lúteos, fetos vivos e reabsorção; de implantes e perdas pré e pós-implantação, total de fetos vivos e mortos por grupo; o peso médio de fetos e de

placentas por ninhada está representado na Tabela 2. Não ocorreram alterações significativas para essas variáveis ($p>0,05$), além de não ter sido detectada nenhuma malformação externa durante a análise macroscópica dos fetos.

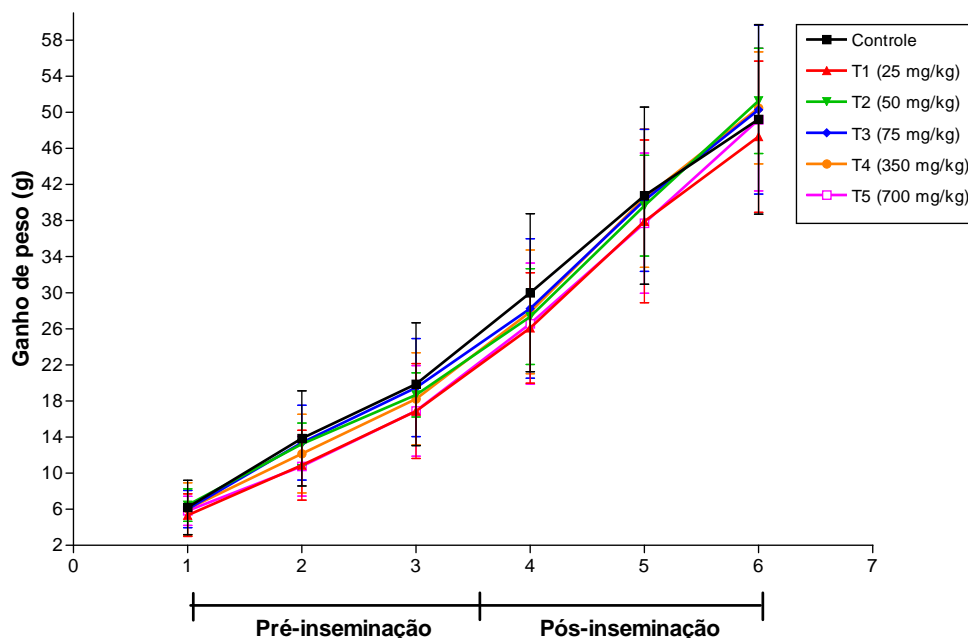


Gráfico 2: Ganho de peso de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o., N=15.

Tabela 1: Peso de órgãos de ratas Wistar controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o.

| Variáveis maternas | Grupos | | | | | |
|--------------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | Controle | T1 (25mg/Kg) | T2 (50mg/Kg) | T3 (75mg/Kg) | T4 (350mg/Kg) | T5 (700mg/Kg) |
| Fígado: | | | | | | |
| peso absoluto (g) | 7,72 ± 0,53 | 7,44 ± 0,88 | 7,52 ± 0,56 | 7,79 ± 0,93 | 7,55 ± 0,50 | 7,17 ± 0,60 |
| peso relativo | 4,01 ± 0,20 | 3,89 ± 0,44 | 3,94 ± 0,26 | 3,98 ± 0,32 | 4,01 ± 0,21 | 3,92 ± 0,22 |
| *Rim: | | | | | | |
| peso absoluto (g) | 0,75 ± 0,05 | 0,71 ± 0,04 | 0,73 ± 0,06 | 0,75 ± 0,06 | 0,71 ± 0,05 | 0,68 ± 0,04 |
| peso relativo | 0,39 ± 0,02 | 0,37 ± 0,02 | 0,38 ± 0,03 | 0,38 ± 0,02 | 0,37 ± 0,02 | 0,37 ± 0,01 |
| Baço: | | | | | | |
| peso absoluto (g) | 0,53 ± 0,07 | 0,54 ± 0,09 | 0,52 ± 0,06 | 0,53 ± 0,04 | 0,47 ± 0,06 | 0,48 ± 0,06 |
| peso relativo | 0,27 ± 0,03 | 0,28 ± 0,04 | 0,27 ± 0,03 | 0,27 ± 0,02 | 0,25 ± 0,02 | 0,26 ± 0,02 |

Resultados expressos em média ± desvio padrão. N = 15. $P>0,05$ *peso médio do rim esquerdo e direito

Tabela 2: Total de corpos lúteos, fetos vivos, implantes e reabsorções, índice de implantação, perda pré-implantação, perda pós-implantação, média de fetos vivos por grupo, peso médio de fetos e de placenta por ninhada em ratas Wistar, controle e tratadas durante o período de pré-inseminação e pós-inseminação com extrato hidroalcoólico de *M. nigra* nas concentrações de 25mg/kg, 50mg/kg, 75mg/kg, 350mg/kg e 700mg/kg, v.o.

| Variáveis | Grupos | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Controle | T1 (25mg/Kg) | T2 (50mg/Kg) | T3 (75mg/Kg) | T4 (350mg/Kg) | T5 (700mg/Kg) |
| Corpos Lúteos | 176 | 166 | 177 | 166 | 176 | 166 |
| Implantes | 167 | 156 | 167 | 153 | 166 | 152 |
| Fetos Vivos | 161 | 152 | 163 | 148 | 158 | 144 |
| Reabsorções | 6 | 4 | 4 | 5 | 8 | 8 |
| Implantação/grupo (%) | 94,88 (167/176) | 93,97 (156/166) | 94,35 (167/177) | 92,16 (153/166) | 94,31 (166/176) | 91,56 (152/166) |
| Perda pré- implantação/grupo (%) | 5,11 (9/176) | 6,02 (10/166) | 5,64 (10/177) | 7,83 (13/166) | 5,68 (10/176) | 8,43 (14/166) |
| Perda pós- implantação/grupo (%) | 3,59 (6/167) | 2,56 (4/156) | 2,39 (4/167) | 3,26 (5/153) | 4,81 (8/166) | 5,26 (8/152) |
| Fetos vivos/grupo | 10,73 ± 1,22 | 10,13 ± 1,06 | 10,86 ± 0,99 | 9,86 ± 2,13 | 10,53 ± 1,92 | 9,40 ± 1,40 |
| Peso fetos/ ninhada (mg) | 164,56 ± 12,95 | 164,20 ± 9,42 | 166,91 ± 11,93 | 162,61 ± 7,10 | 167,33 ± 8,91 | 168,55 ± 9,78 |
| Peso placentas /ninhada (mg) | 140,29 ± 15,42 | 144,82 ± 20,45 | 140,71 ± 15,68 | 140,41 ± 24,27 | 150,72 ± 15,10 | 145,81 ± 22,24 |

Resultados expressos em média ± desvio padrão. N = 15. P>0,05

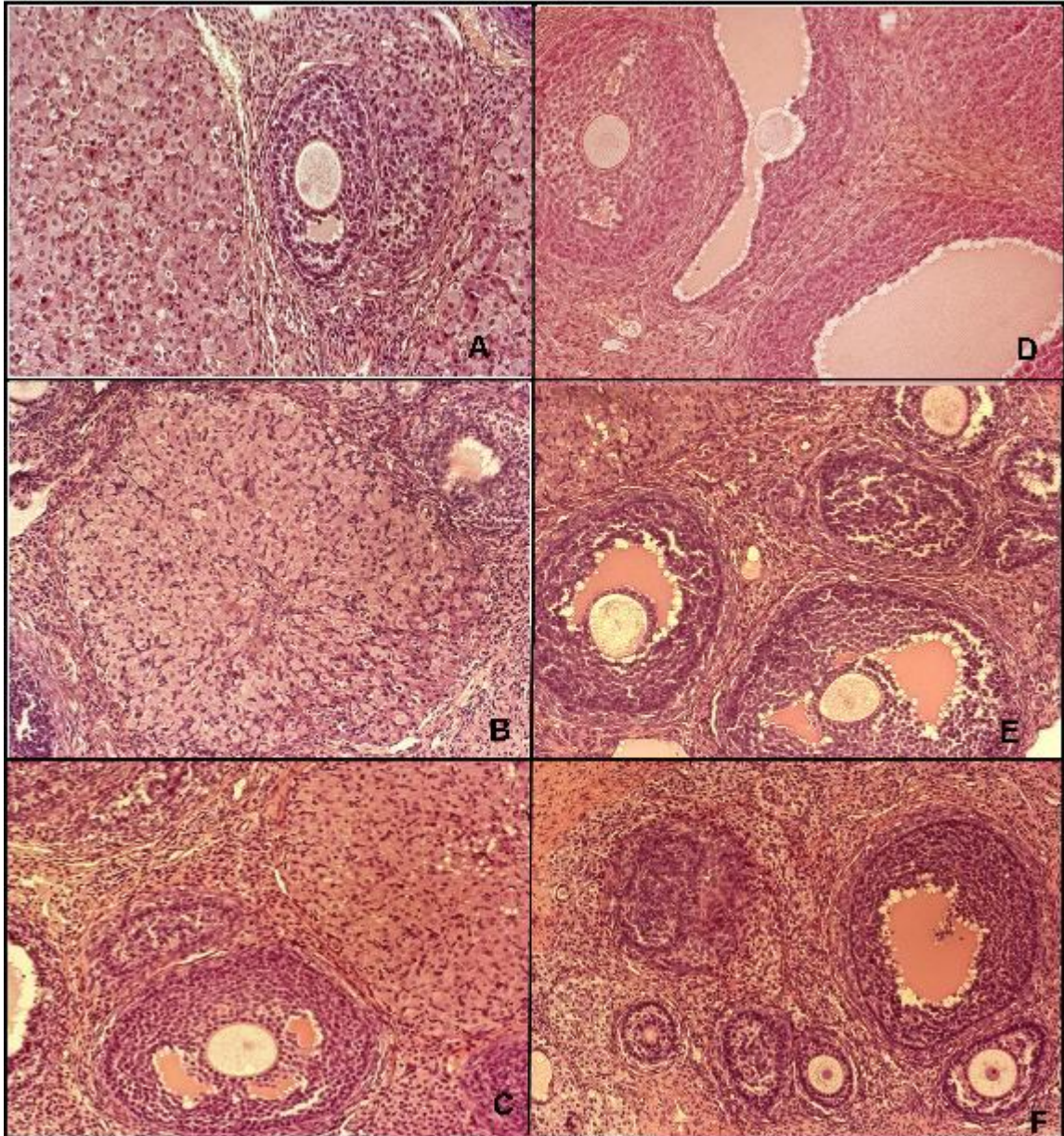


Figura 2: Ovário de ratas Wistar durante a fase progesteronal (A, B C) e estrogênica (D, E, F) demonstrando folículos em diferentes fases de desenvolvimento. Animais do grupo controle (A e D) e grupo tratado com extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* 350mg/Kg (B e E), tratado com extrato hidroalcoólico *Morus nigra* 700mg/Kg (C e F).

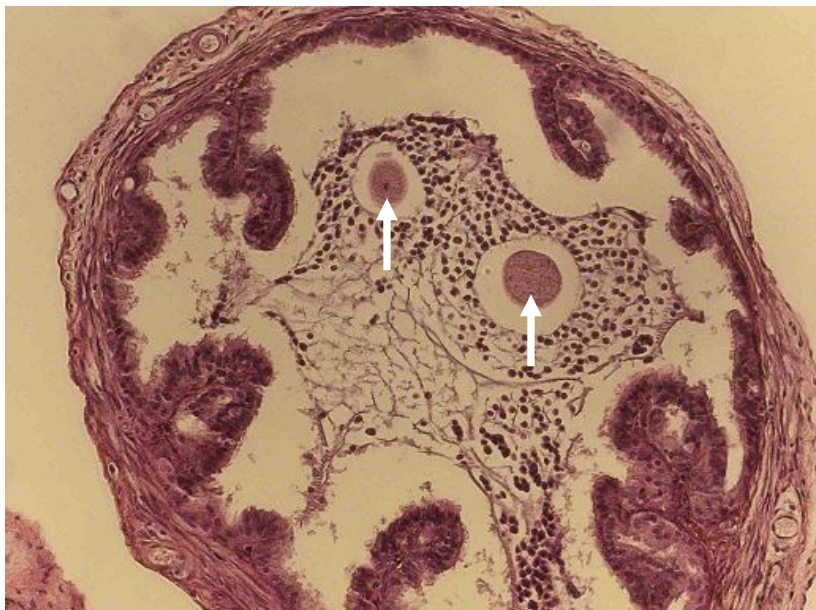


Figura 3: Tuba uterina do animal do grupo tratado com o extrato hidroalcoólico de *M. nigra* na concentração de 350 mg/Kg (T6) demonstrando a presença de ovócitos (setas) (10x).

4. Discussão

Devido às referências de uso popular do chá de folhas de *Morus nigra* no alívio de manifestações de fogacho e de tensão pré-menstrual (MIRANDA *et al.*, 2010), seria possível supor que entre os componentes das folhas de *Morus nigra* L. fossem encontradas substâncias capazes de exercer algum efeito estrogênico ou progesterônico e, de fato, a triagem fitoquímica mostrou a presença de taninos, flavonóides, triterpenos/esteróides, polifenóis e cumarinas. Sabidamente flavonóides e triterpenos podem ter efeito semelhante ao estrogênio (IBARRETA *et al.*, 2001; JEFFERSON, 2003), o que poderia justificar o uso popular.

A função reprodutiva da fêmea foi avaliada através da citologia vaginal, análise histológica de ovários e histomorfometria do útero. Ciclos em que a alternância entre as fases não siga a sequência proestro, estro, metaestro e diestro são considerados irregulares ou anormais (MARCONDES *et al.*, 2002), cornificação vaginal persistente, com consequente aumento na duração do ciclo estral, diestro ou estro prolongado, podem ser indicativos de bloqueio da ovulação (EPA, 1996; GOLDMAN *et al.*, 2007).

Utilizando as doses mais elevadas do extrato, não foram encontradas alterações morfológicas nem da ciclicidade vaginal das ratas, inclusive observou-se ovulação no grupo tratado 6, conforme pode ser evidenciado pela presença de dois ovócitos na tuba uterina (FIGURA 3). Não foram observadas diferenças significativas na morfologia geral dos ovários,

que exibiam folículos em diversas fases do desenvolvimento, assim como não ocorreu alteração na morfologia e espessura do epitélio uterino. Dessa forma, sob o ponto de vista da metodologia empregada no presente trabalho o extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* não parece ter efeito semelhante aos hormônios ovarianos.

Em mamíferos, a fisiologia materna normal é indispensável para o desenvolvimento normal do feto e da prole (CHAHOU *et al.*, 1999), dessa forma a avaliação do peso corporal materno, peso dos órgãos e o consumo de alimento são dados considerados importantes para a avaliação das condições maternas. Além disso, sinais físicos que indiquem estresse materno como pêlos eriçados, diarreia, sialorréia, pouca deambulação nas gaiolas e outros, podem acarretar alterações de cortisona e afetar o desenvolvimento embrionário (CHRISTIAN, 2001; HOOD e MILLER, 2006; CHERNOFF *et al.*, 2008). Nenhum desses indícios foi observado entre os animais dos grupos experimentais, indicando a provável ausência de toxicidade do EHMn, observável pelos indícios clínicos e morfológicos.

Ercisli e Orhan (2007) relatam que a *M. nigra* apresenta elevado conteúdo de fenóis e de flavonóides nos frutos, este último, relacionado à quercetina. Sabe-se que a quercetina tem afinidade pelos receptores estrogênicos do tipo beta (HAVSTEEN, 2002), que embora existam em todas as células endometriais, predominam nas células do estroma subepitelial e estão comprometidas com a decidualização (LI e DAVIS, 2007). Tendo-se encontrado flavonóides na triagem fitoquímica de *M. nigra* poderia ser esperada alteração do processo de decidualização e, conseqüentemente, do desenvolvimento embrionário. Além disso, sabe-se que a alteração do balanço hormonal estrogênio/progesterona pode acarretar alterações no processo de trânsito tubário do zigoto/embrião, interferindo no momento preciso da implantação no endométrio, o que pode levar a redução do número de embriões/fetos (CROXATTO *et al.*, 1991).

Pelo que pode ser observado, o índice de implantação, que é um indicador do sucesso da implantação do blastocisto no endométrio (TYL e MARR, 2006), foi semelhante em todos os grupos experimentais, o que indica que não deve ter existido modificação nas concentrações hormonais necessárias ao trânsito, desenvolvimento e implantação do blastocisto, o que foi corroborado pelo número semelhante de reabsorções, que são indicativas de falhas no desenvolvimento pós-implantação (KALTER, 1980).

Segundo Chahoud *et al.*, (1999), o crescimento normal dos fetos depende da combinação de fatores imunológicos, nutricionais, vasculares, genéticos, endócrinos e fatores ambientais, sendo que qualquer alteração nestes fatores interrompe o crescimento e desenvolvimento normal do embrião/feto. Como já foi relatado, não foram observadas

alterações clínicas indicativas de toxicidade materna, entretanto, o efeito hipoglicemiante atribuído as folhas *M. nigra* (ORYAN *et al.*, 2003) e o relato de atividade antineoplásica conferida aos compostos fenólicos além da habilidade de modificar a expressão gênica (TAPIERO, 2002; NAKAMURA *et al.*, 2003), poderia causar alguma perturbação no desenvolvimento embrionário. Os dados observados mostram que não ocorreram alterações no número de fetos obtidos, na massa corporal de fetos, no peso de placenta e nem quaisquer alterações na morfologia externa, o que sugere ausência de efeitos tóxicos ou teratogênicos durante o desenvolvimento embrionário. Tais dados, entretanto, necessitam de confirmação por estudos mais detalhados sobre a organogênese e fetogênese, além do desenvolvimento pós-natal das crias.

Além disso, os flavonóides obtidos no extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* podem estar na forma de heterosídeos e a absorção dos flavonóides glicosilados é baixa no organismo, necessitando de hidrólise prévia para que, na sua forma aglicona, sejam absorvidos (DAY *et al.*, 1998, GEE *et al.*, 1998, GRAEFE *et al.*, 2001). Consequentemente, pode ser que uma absorção deficiente tenha resultado na pouca ou nenhuma interação com os receptores estrogênicos.

Em conclusão, o extrato hidroalcoólico de *Morus nigra*, no modelo experimental apresentado, não demonstrou toxicidade reprodutiva e no desenvolvimento embrionário, nem evidenciou atividade estrogênica.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao professor Luis Cláudio Ribeiro do Departamento de Estatística da UFJF a análise estatística e às Redes Mineiras de Bioterismo (172/08) e de Toxicologia e Farmacologia de Produtos terapêuticos (173/08), FAPEMIG, Brasil, o financiamento do projeto.

6. Referências bibliográficas:

AWAD, A. B.; BURR, A. T.; FINK, C. S. Effect of resveratrol and betasitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. **Prostagland. Leukot Essent Fatty Acids**, v. 72, p.219–226, 2005.

BOLZAN, V. C. **Efeito do extrato das folhas da *Morus nigra* sobre a citologia vaginal e níveis plasmáticos de hormônios sexuais femininos em ratas wistar.** 2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Universidade Federal de Ciências da Saúde, Porto Alegre, 2008.

CASTRO, A. S. **Efeito de *Morus nigra* L. como terapia hormonal em ratas ooforectomizadas.** 2010. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

CHAHOU, I. et al. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reprod. Toxicol.**, Nova York, v. 13, n. 5, p. 375-381, set/ou. 1999.

CHERNOFF, N. et al. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the “no observed adverse effect level.” **Reprod. Toxicol.**, [S.l.], v. 25, p.192–202, feb. 2008.

CHRISTIAN, M. S. Test Methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYS, W. **Method. of Toxicology.** Philadelphia: Taylor & Francis, p. 1301-81, 2001.

CROXATTO, H. et al. Hormonal control of ovum transport through the rat oviduct, **Arch. Biol. Med. Grap.**, [S.l.], v. 24, n. 3, p. 403-410, sept. 1991.

DAY, A. J. et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. **FEBS Lett.**, [S.l.], v. 436, p. 71-75, sept. 1998.

DUGO, P. et al. Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore highperformance liquid chromatography with electrospray ionization detection. **J. Agric. Food Chem.**, [S.l.], v. 49, p. 3987–3992, aug. 2001.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency) Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. **Federal Register**, 61(212):56274-56322, 1996.

ERCISLI, S. e ORHAN, E.. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 103, p. 1380–1384, oct. 2007.

GEE, J. M. et al. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. **Free Rad. Biol. Med.**, United States, v. 25, p.19-25, jul. 1998.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.**, United States, v. 80, n. 2, p. 84-97, apr 2007.

GRAEFE, E. U. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. **J. Clin. Pharmacol.** [S.l.], v. 41, p. 492-499, may. 2001.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus*). **Food Sci. Technol. Int.**, United States, v. 13, p.17–25, apr. 2007.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeut.**, Oxford, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, nov/dec. 2002.

HOOD, R. D.; MILLER, D. B. Maternally mediated effects on development. In: HOOD, R. D. **Developmental and reproductive toxicology: a practical approach**. 2nd ed. London: Taylor & Francis. p. 93–124, 2006

IBARRETA, D.; DAXENBERGER, A.; MEYER, H. H. D. Possible health impact of phytoestrogens and xenoestrogens in food. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 109, n. 3, p. 161-184, mar. 2001.

JEFFERSON, A. Dietary phytoestrogens – a role in women's health. **Nutrit. and Food Scienc.**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 16-22, 2003.

KALTER, H. The relationship between congenital malformations and prenatal mortality in experimental animals. In: Potter I.(ed), Hook EB. **Human embryo. and fetal death**. New York: Academic Press, p.29-44, 1980.

KESHRI, G; LAKSHMI, V; SINGH, M. M. Pregnancy interceptive activity of *Melia azedarach* Linn. in adult female Sprague-Dawley rats. **Contraception**, [S.l.], v. 68, p.303-306, oct. 2003.

KIM, H. G. et al. Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. **British Journ. of Nutrit.**, Cambridge, v. 104, n. 1, p. 8–16, feb. 2010.

KOYUNCU, F. Organic acid composition of native black mulberry fruit. **Chem. Nat. Compd**, [S.l.], v. 40, p. 367–369, 2004.

LI, S.; DAVIS, B.. Evaluating Rodent Vaginal and Uterine Histology in Toxicity Studies. **Birth Defec. Research**, [S.l.], v. 80, p. 246-252, 2007.

LIN, J. e TANG, C. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation, **Food Chemistry**, v. 101, p. 140–147, 2007.

MARCONDES, F. K.; BIANCH, I. F. J.; TANNO, A. P. Determination of the Estrous Cycle phases of Rats: Some Helpful Considerations. **Brazil. Journal of Biology**, São Carlos, v. 62, n. 4, p. 609-614, nov. 2002.

- MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: UFC, 128 p., 1997.
- MIRANDA, M. A. et al, Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 36, n. 1, p. 61-68, jan/mar. 2010.
- NAKAMURA, Y. et al. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **J. Agric. Food Chem.**, [S.l.], v. 51, n. 11, p. 3309-3312, apr. 2003.
- NADERI, A. G. *et al.* Antioxidant Activity of Three Extracts of *Morus nigra*. **Phytother. research**, [S.l.], v. 18, n. 5, p. 365–369, may. 2004.
- OLIVEIRA, M. C. C. de et al. Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 182-184, mar/abr. 1999.
- ORYAN, S. et al. Hypoglycaemic effect of alcoholic extract of *Morus nigra* L. leaves in normal and diabetic rats. **J. of Med. Plant.**, [S.l.], v.2, p. 27-32, jun. 2003.
- PADILHA, M. M. et al., Antiinflammatory Properties of *Morus nigra* Leaves. **Phytother. research**, [S.l.], v. 24, p. 1496–1500, oct. 2010.
- PARKER, R. M. Testing for reproductive toxicity. In: HOOD, R. D. (Ed). **Developmental and reproductive toxicology - a practical approach**. Londres: Taylor and Francis, p.525-587, 2006.
- PAWLOWSKA, A. M.; OLESZEK, W.; BRACA, A. Quali-quantitative Analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) Fruits. **J. Agric. Food Chem.**, [S.l.] v. 56, n. 9, p. 3377–3380, apr. 2008.
- PETLEVSKI, R. et al. Effect of 'antidiabetis' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. **J. Ethnopharmacol**, Ireland, v. 75, n. 2-3, p. 181-4, may. 2001.
- SEERAM, N. P.; MOMOIN, M. G.; BOURQUIN, L. D. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. **Phytomedicine**, v. 8, p. 362-369, 2001.
- SILVA, I. O. et al. Avaliação do potencial estrogênico de *Morus* sp em ratas Wistar. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 22, p. 49-57, 2003
- SONG, W. et al. Phytochemical profiles of different mulberry (*morus* sp.) species from china. **J. Agric. Food Chem.**, United States, v. 57, p. 9133–9140, oct. 2009.
- TAPIERO, H. et al. Do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomed. Pharmacother**, [S.l.], v. 56, p.200-207, jun. 2002.

TYL, R. W. e MARR, M.C. Development toxicity testing – Methodology. 2005. In: HOOD, R. D. (ed.). **Developmental and reproductive toxicology - a practical approach**. 2nd. ed. Londres: Taylor & Francis, p. 201-61, 2006.

VANONI, A. P. N. B. **Avaliação da atividade fitoestrogenica do extrato hidoralcoolico e da infusão das folhas de Morus nigra L.** 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

WASANO, N. et al. A unique latex protein, MLX56, defends mulberry trees from insects **Phytochemistry**, [S.l], v. 70 n. 7, p. 880–888, 2009.