

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PERI E PÓS-NATAL (SEGMENTO III) DA
OLEUROPEÍNA EM RATOS WISTAR**

MURIEL RODRIGUES FERRAZ DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE/RS

2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PERI E PÓS-NATAL (SEGMENTO III) DA
OLEUROPEÍNA EM RATOS WISTAR**

**Autora: Muriel Rodrigues Ferraz de Oliveira
Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na área de Toxicologia
Animal**

**Orientador: Prof. Dr. João Roberto Braga de
Mello**

PORTO ALEGRE/RS

2021

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Muriel Rodrigues Ferraz de
Avaliação da Toxicidade Peri e Pós-Natal (Segmento
III) da Oleuropeína em Ratos Wistar / Muriel Rodrigues
Ferraz de Oliveira. -- 2021.
72 f.
Orientador: João Roberto Braga de Mello.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2021.

1. Oliveira. 2. Olea europaea. 3. Oleuropeína. 4.
Toxicidade Reprodutiva. I. Mello, João Roberto Braga
de, orient. II. Título.

Muriel Rodrigues Ferraz de Oliveira

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PERI E PÓS-NATAL (SEGMENTO III) DA
OLEUROPEÍNA EM RATOS WISTAR

Aprovada em 3 MAR 2021

APROVADA POR:

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello
Orientador e Presidente da Comissão

Profª Draª Fernanda Bastos de Mello
Membro da comissão

Profª Draª Marlete Brum Cleff
Membro da comissão

Prof. Dr. Mario Carlos Araújo Meireles
Membro da comissão

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter cuidado de cada mínimo detalhe desde o dia em que escolhi minha profissão, por ter me guiado e capacitado para chegar até onde cheguei. “[...] *pois eu sei em quem tenho crido e estou certo de que Ele é poderoso [...]*” (2 Timóteo 1:12).

Ao meu professor orientador Dr. João Roberto Braga de Mello, pela confiança, disposição, paciência e aconselhamento, me orientando e guiando durante o crescimento acadêmico desde a graduação. Serei eternamente grata pela oportunidade de aprender com o senhor. Muito obrigada!

Aos meus pais, Valdir e Lucia, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim e pelo apoio em todos os momentos. Essa vitória é para vocês!

Ao Humberto, meu parceiro, melhor amigo e namorado. Agradeço-te por todos os momentos em que me olhou com carinho e paciência e deu teu melhor sorriso para me motivar!

À professora Dra. Fernanda Bastos de Mello, que sempre disposta a colaborar, me guiou e orientou durante todas as fases da pesquisa com muita paciência e carinho! Muito obrigada!

Às minhas colegas Gisele Seberino e Raquel Breunig, jamais esquecerei o quanto me ajudaram nesse período! Obrigada pela amizade e parceria!

Às estagiárias que contribuíram com seriedade, respeito, sabedoria e amizade: Carolina, Ester e Thailana. A todos os funcionários e laboratoristas do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) pelo apoio.

À Lais Jardim por estar sempre disposta a ajudar e aconselhar em todos os momentos!
Muito obrigada!

A todo Setor de Patologia Veterinária UFRGS em especial ao Professor David Driemeier.

Aos meus familiares e amigos, por todas as orações e carinho, por entenderem meus momentos de ausência e, finalmente, por torcerem por mim sempre.

RESUMO

A oleuropeína é o composto fenólico majoritário nas folhas da oliveira e tem sido apontada como responsável pela maioria dos atributos terapêuticos da planta. Apesar dos inúmeros estudos a respeito dos benefícios da utilização da oliveira e seu composto majoritário, a oleuropeína, poucos são os dados na literatura referentes a sua toxicidade. Tendo em vista a importância de se verificar a toxicidade reprodutiva deste composto fenólico, nesse estudo foram investigados os efeitos da oleuropeína na prole de ratas *Wistar*, a partir da exposição durante os períodos de gestação e lactação as doses de 2000 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 500 mg/kg/dia (G3), e um grupo controle negativo que foi exposto a água destilada (CN). A progênie foi avaliada quanto ao seu desenvolvimento físico e sexual, por meio da observação visual das seguintes características: penugem, descolamento dos pavilhões auriculares, pelo, erupção dos dentes incisivos, abertura dos olhos, separação prepucial e abertura do canal vaginal. O desenvolvimento motor foi avaliado por meio de testes de reflexo, como: teste de endireitamento em superfície, geotaxia negativa e resposta ao agarrar. Foram realizados os testes de comportamento em campo aberto, para avaliação de ansiedade, e comportamento sexual, para avaliação de taxas reprodutivas. Foram analisados, ainda, o peso relativo dos órgãos e, nos machos, número e morfologia espermática. Os animais dos grupos G1 e G2 abriram os olhos mais tarde em comparação ao grupo controle ($P < 0,01$), o G3 apresentou atraso no descolamento do pavilhão auricular ($P < 0,001$), porém a característica de erupção de dentes incisivos foi precoce neste grupo em comparação ao grupo controle ($P = 0,023$). Os animais do grupo G1 também apresentaram atraso na separação prepucial ($P < 0,001$). No dia pós-natal 7 e 8 os animais dos grupos G1 e G2 demoraram mais para reorientarem-se no reflexo de geotaxia negativa ($P < 0,001$), os mesmos grupos permaneceram menos tempo agarrados no 14º dia pós-natal ($P < 0,001$). Os animais do grupo G1 ($4,79 \pm 0,44$) apresentaram uma maior porcentagem de anormalidades na morfologia espermática, em comparação ao grupo controle negativo ($2,17 \pm 0,33$). O G3 ($27,09 \pm 3,63$) também permaneceu mais tempo nos quadrantes centrais no teste de campo aberto quando comparado ao grupo controle ($15,38 \pm 1,68$). Nossos resultados demonstram que a exposição à oleuropeína interferiu no desenvolvimento físico e reprodutivo da progênie, o que limita sua recomendação durante os períodos gestacional e lactacional, especialmente em altas doses. Contribuindo com a elucidação de algumas questões referentes a segurança do seu uso como agente terapêutico.

Palavras-chave: Oliveira; *Olea europaea*; Oleuropeína; Toxicidade reprodutiva.

ABSTRACT

*Oleuropein is the major phenolic compound in olive leaves and has been identified as responsible for most of the plant's therapeutic attributes. Despite numerous studies on the benefits of using *Olea europaea* and its major compound, oleuropein, there are few data in the literature regarding its toxicity. In view of the importance of verifying the reproductive toxicity of this phenolic compound, in this study the effects of oleuropein on the offspring of Wistar rats were investigated, from the exposure during the gestation and lactation periods at doses of 2000 mg/kg/day (G1), 1000 mg/kg/day (G2) and 500 mg/kg/day (G3), and a negative control group that was exposed to distilled water (CN). The progeny was evaluated for their physical and sexual development, through visual observation of the following characteristics: fluff, detachment of the auricular pavilion, fur, eruption of incisor teeth, eye opening, preputial separation and opening of the vaginal canal. Motor development was evaluated through reflex tests, such as: surface straightening test, negative geotaxy and grapple test. Behavior tests in the open field, to assess anxiety, and sexual behavior, to evaluate reproductive rates, were performed. The relative organs weight and, in males, sperm number and morphology were also analyzed. The animals in groups G1 and G2 opened their eyes later in comparison to the control group ($P < 0,01$), G3 showed delay in the detachment of the auricular pavilion ($P < 0,001$), however the incisor teeth eruption characteristic was early in this group compared to the control group ($P = 0,023$). The animals in the G1 group also showed delay in the preputial separation ($P < 0,001$). In the 7 and 8 postnatal day, the animals in the G1 and G2 groups took longer to reorient themselves in the geotaxis reflex ($P < 0,001$), the same groups spent less time on the grapple test on the 14 postnatal day ($P < 0,001$). The animals in the G1 ($4,79 \pm 0,44$) group showed a higher percentage of abnormalities in sperm morphology compared to the negative control group ($2,17 \pm 0,33$). The group G3 ($27,09 \pm 3,63$) also remained longer in the central quadrants in the open field test when compared to the control group ($15,38 \pm 1,68$). Our results demonstrate that exposure to oleuropein interfered with the progeny's physical and reproductive development, restricting its recommendation during gestational and lactational periods, especially in high doses. Contributing to the elucidation of some issues regarding the safety of its use as a therapeutic agent.*

*Keywords: Olive tree, *Olea europaea*, Oleuropein, Reproductive toxicity*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química da oleuropeína.....	19
Figura 2 -	Linha do tempo do experimento. Procedimentos realizados nos animais do segmento III (MF1 - Machos da geração F1; FF1 - Fêmeas da geração F1; PF2 – Progênie geração F2).....	29
Figura 3 -	Evolução da massa corporal (g) individual da progênie exposta via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Os valores representam a média dos grupos (n=104, 88, 144 e 112, respectivamente). ANOVA de medidas repetidas (P=0,05).....	36
Figura 4 -	Característica de desenvolvimento comportamental (Endireitamento em Superfície) (segundos) da progênie exposta via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em mediana e percentis (n= 96, 88, 144 e 112, respectivamente). Kruskal-Wallis seguido de teste de Bonferroni (P>0,05).....	38
Figura 5 -	Característica de desenvolvimento comportamental (Geotaxia Negativa) (segundos) da progênie exposta via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em mediana e percentis (n=96, 88, 144 e 112, respectivamente). & Diferença significativa (P<0,001), em relação ao grupo controle negativo (CN). Kruskal-Wallis seguido de teste de Bonferroni.....	39
Figura 6 -	Característica de desenvolvimento comportamental (Resposta de Agarrar) (segundos) da progênie exposta via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em mediana e percentis (n=96, 88, 144 e 112, respectivamente). & Diferença significativa (P<0,05), em	

	relação ao grupo controle negativo (CN). Kruskal-Wallis seguido de teste de Bonferroni.....	40
Figura 7 -	Massa corporal relativa durante a gestação das progenitoras (1º dia = 100%) expostas via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM (n=10, 13, 11 e 8, respectivamente)	44
Figura 8 -	Massa corporal relativa durante a lactação das progenitoras (1º dia = 100%) expostas via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM (n=10, 13, 11 e 8, respectivamente). * Diferença significativa (P<0,05), em relação ao grupo controle negativo. ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.....	45
Figura 9 -	Evolução da massa corporal (g) individual da progênie (geração F2) de machos e fêmeas (geração F1) expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3) durante os períodos de gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos (n=64, 72, 80 e 80, respectivamente). ANOVA de medidas repetidas (P>0,05).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Benefícios da oleuropeína.....	20
Tabela 2 -	Características de desenvolvimento geral e sexual da progênie exposta via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em mediana e percentis. (n = 104, 88, 144, 112 respectivamente para ninhadas e 53, 44, 78, 56 para machos respectivamente e 51, 44, 66, 56 para fêmeas respectivamente).....	37
Tabela 3 -	Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos púberes expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM.....	41
Tabela 4 -	Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas púberes expostas via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM.....	41
Tabela 5 -	Índices de fertilidade dos machos púberes expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM ou percentual.....	42
Tabela 6 -	Parâmetros de comportamento em campo aberto de machos expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM.....	43
Tabela 7 -	Parâmetros de comportamento sexual de machos e fêmeas adultos expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de	

	oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM.....	43
Tabela 8 -	Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas adultas expostas via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM.....	45
Tabela 9 -	Índices de fertilidade das fêmeas adultas expostas via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em percentual ou média ± EPM.....	46
Tabela 10 -	Características de desenvolvimento geral e sexual da progênie (geração F2) de machos e fêmeas (geração F1) expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em mediana e percentis. (n = 64, 72, 80 e 80 respectivamente para ninhadas e 26, 38, 37 e 45 para machos respectivamente e 38, 34, 43 e 35 para fêmeas respectivamente).....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CN	Grupo Controle Negativo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Proteção Ambiental)
FDA	Food and Drug Administration (Departamento de Alimentos e Remédios)
g	Gramas
G1	Grupo 1 (500 mg/kg/dia de oleuropeína)
G2	Grupo 2 (1000 mg/kg/dia de oleuropeína)
G3	Grupo 3 (2000 mg/kg/dia de oleuropeína)
HIDROX	Hydrolyzed Aqueous Olive Pulp Extract (Extrato Aquoso de Polpa de Oliva)
Kg	Kilogramas
mg	Miligramas
ml	Mililitros
NaCl	Cloreto de Sódio
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development (Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento)
PND	Postnatal day (Dia pós-natal)
RS	Estado do Rio Grande do Sul
UFRGS	Universidade federal do Rio Grande do Sul
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivo específico.....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	<i>Olea europae</i> L. – Oliveira	17
3.2	Oleuropeína	19
3.2.1	Química.....	19
3.2.2	Atividades farmacológicas da oleuropeína.....	20
3.2.3	Toxicidade da oleuropeína.....	22
3.2.4	Avaliação toxicológica.....	23
3.2.4.1	Testes sobre toxicidade reprodutiva.....	24
3.2.4.2	Desenvolvimento dos filhotes.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Insumos	27
4.2	Protocolo Experimental para Toxicidade Peri e Pós-Natal (Segmento III)	27
4.2.1	Animais.....	27
4.2.2	Delineamento experimental.....	28
4.2.3	Avaliação geral da prole.....	29
4.2.4	Desenvolvimento físico geral.....	30
4.2.5	Eutanásia dos machos na puberdade.....	30
4.2.5.1	Avaliação espermática.....	31
4.2.6	Eutanásia das fêmeas na puberdade.....	32
4.2.7	Teste de comportamento em campo aberto.....	32
4.2.8	Teste de comportamento sexual.....	33
4.2.9	Análise dos testes de comportamento.....	33
4.2.10	Avaliação de variáveis das fêmeas adultas e progênie.....	33
4.2.10.1	Parâmetros Reprodutivos.....	34
4.2.10.2	Evolução da massa corporal gestacional e lactacional.....	34
4.2.10.3	Eutanásia e coleta de órgãos.....	34

4.2.10.4	Avaliação geral da prole.....	35
4.2.11	Análise estatística.....	35
5	RESULTADOS.....	36
5.1	Desenvolvimento ponderal.....	36
5.2	Desenvolvimento físico e motor.....	36
5.3	Peso de órgãos.....	40
5.4	Índices de fertilidade de machos púberes.....	42
5.5	Campo aberto.....	42
5.6	Comportamento sexual.....	43
5.7	Variáveis das fêmeas na fase adulta.....	44
5.7.1	Variáveis das progênies.....	46
6	DISCUSSÃO.....	49
6.1	Avaliação geral da prole (Geração F1).....	49
6.2	Peso de órgãos.....	52
6.3	Índices reprodutivos de machos púberes.....	52
6.4	Campo aberto.....	53
6.5	Comportamento sexual.....	54
6.6	Variáveis das fêmeas na fase adulta.....	56
6.6.1	Evolução da massa corporal nos períodos de gestação e lactação.....	56
6.6.2	Peso de órgãos.....	56
6.6.3	Parâmetros reprodutivos.....	57
6.6.4	Avaliação da prole (Geração F2).....	57
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	ANEXO 1.....	72
	ANEXO 2.....	73
	ANEXO 3.....	77

1 INTRODUÇÃO

A produção de novos fármacos utilizando substâncias extraídas de plantas com potencial terapêutico, tem sido o foco de muitos cientistas em diferentes regiões do planeta (HUSSAIN *et al.*, 2011). Em 2008, Silva e colaboradores estimaram que 33% de todas as novas substâncias químicas lançadas no mercado eram provenientes de produtos naturais. A busca por fármacos oriundos de fontes naturais com ação antimicrobiana vem aumentando devido ao seu baixo custo, facilidade de acesso e por serem renováveis (PEREIRA, 2009; VENTUROSIO *et al.*, 2011). A Organização Mundial da Saúde (OMS), reconhece a importância do uso de plantas medicinais como um recurso de assistência farmacêutica viável e de baixo custo, estimando que 70% a 90% da população nos países em desenvolvimento, depende do uso da medicina tradicional para suas necessidades de cuidados primários de saúde (WHO, 2011). Segundo Rodrigues & De Simoni (2010), no Brasil, em torno de 82% da população faz uso de produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde. Mesmo com seu vasto uso na medicina tradicional, poucas são as plantas medicinais estudadas segundo os atuais protocolos emitidos por órgãos científicos internacionais (CAPASSO *et al.*, 2000; VEIGA JUNIOR, 2008).

A capacidade de produzir frutos contendo óleo de qualidade e uma ampla adaptação geográfica, são fatores que garantiram a sobrevivência da oliveira no século XXI como uma das principais espécies alimentares (KAILIS, 2017). A baixa incidência de doenças cardiovasculares e câncer nos países mediterrâneos chamou a atenção de pesquisadores, e a dieta mediterrânea composta de azeitonas e subprodutos da oliveira foi considerada uma das razões para este fenômeno (ERBAY; ICIER, 2010). As indicações terapêuticas na medicina tradicional apontam para sua utilização na redução de glicemia, do colesterol e de ácido úrico. Sendo empregada no tratamento de diabetes, hipertensão, inflamação, diarreia, infecções do trato respiratório e urinário, doenças gástricas e intestinais, asma e reumatismo (HASHMI *et al.*, 2015). A oleuropeína é o composto fenólico majoritário nas folhas da oliveira, e tem sido apontada como responsável pela maioria dos atributos terapêuticos da planta (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015; ÖZCAN; MATTHÄUS, 2017). Contudo, o número limitado de estudos de segurança pré-clínica para extratos de folhas da *Olea europaea* L. e dados toxicológicos concernentes à oleuropeína, restringem a possibilidade de seu uso (EMA, 2011).

Os estudos comumente utilizados para avaliação da toxicidade reprodutiva são divididos em três segmentos, adaptando-se as normas da ANVISA com as normas internacionais guiadas pela *Environmental Protection Agency* (EPA) e recomendadas pela OECD e FDA, são eles:

Segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva” onde são avaliados os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento; Segmento II “Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade” que caracteriza-se pelo estudo de teratogenicidade, com exposição da progênie durante a fase de organogênese; Segmento III “Toxicidade peri e pós-natal” através da avaliação de efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação (OECD, 2001; LEMONICA *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, a importância clínica atribuída às micoses em animais domésticos vêm crescendo (MEINERZ *et al.*, 2007; PRESTES *et al.*, 2008), e conseqüentemente, a resistência desses microrganismos sobre antifúngicos disponíveis no mercado também é crescente. Isso, aliado às dificuldades representadas pelo tempo de administração, toxicidade e alto custo, tem impulsionado a procura por novas alternativas terapêuticas para o controle dessas doenças, de modo que os fitoterápicos surgiram como uma possibilidade no desenvolvimento de novos fármacos (ABAD *et al.*, 2007; BRASIL, 2002; CHAMI *et al.*, 2004; GIORDANI *et al.*, 2004).

Nosso grupo, há anos, vem desenvolvendo pesquisas com intuito de investigar a ação de diferentes óleos essenciais frente a doenças fúngicas. Inúmeros estudos já foram realizados, utilizando substâncias naturais, como o Própolis (*Apis mellifera*) e derivadas de plantas como o Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), o Orégano (*Origanum majorana* L.) e a Manjerona (*Origanum majorana*). Os estudos compreendem ensaios *in vitro* e *in vivo*, incluindo a caracterização dos componentes presentes nos diferentes óleos, ensaios de mutagenicidade, avaliações quanto aos seus potenciais de toxicidade e testes, tanto com doenças fúngicas induzidas, como no tratamento de casos clínicos. Dentre as micoses que já foram alvo de testes, pode-se destacar a Esporotricose (Complexo *Sporothrix schenckii*), a Aspergilose (*Aspergillus* spp.) e a Candidíase (*Candida* spp.). (CLEFF *et al.*, 2008; CLEFF *et al.*, 2013; HOLLENBACH *et al.*, 2014; OSÓRIO *et al.*, 2014; SANTIN *et al.*, 2014; HOLLENBACH *et al.*, 2015; DANTAS *et al.*, 2016; WALLER *et al.*, 2016; WALLER *et al.*, 2017;). E recentemente projetos de pesquisa que envolvem a análise química e a prospecção de substâncias com promissora atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de diferentes frações da *Olea europaea* L. Ripoll (2019), testou a suscetibilidade *in vitro* de extratos aquosos de *Olea europaea* frente a fungos filamentosos e leveduriformes, obtendo resultados efetivos contra duas cepas padrões de *Candida albicans* em concentrações a partir de 3,12 mg/mL, demonstrando seu potencial promissor como agente antifúngico.

Os estudos pré-clínicos em modelos animais são capazes de gerar resultados importantes sobre alterações em aspectos fisiológicos como reprodução, fertilidade e

desenvolvimento da prole. A exposição via útero e lactação da progênie de ratos Wistar tratados com diferentes doses de oleuropeína, visa analisar os efeitos significativos no desenvolvimento (peri e pós-natal), reprodução e comportamento dos animais, de forma a caracterizar o aspecto toxicológico deste composto. A realização desses ensaios de avaliação toxicológica é de grande importância para atestar que o composto fenólico oleuropeína, presente na planta *Olea europaea* L., não exerce atividades tóxicas que inviabilizem sua utilização em saúde humana e/ou animal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os potenciais riscos toxicológicos da utilização da oleuropeína nos períodos peri e pós-natal em ratos Wistar, contribuindo para a elucidação de questões relacionadas à segurança do seu uso como agente terapêutico.

2.2 Objetivo específico

Avaliar os efeitos da oleuropeína sobre o desenvolvimento da progênie de ratos Wistar, exposta a três doses diferentes do composto, durante as fases do desenvolvimento fetal e lactação; quanto ao seu desenvolvimento físico e sexual, parâmetros reprodutivos, comportamentos em campo aberto e sexual (Segmento III).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Olea europaea* L. – Oliveira

A família *Oleaceae* é composta por 30 gêneros, sendo um deles o gênero *Olea*, que compreende cerca de 30 espécies (KAILIS, 2017). A espécie *Olea europaea* L. têm sua origem nas regiões temperadas da Europa, África e Ásia, embora tenha sido cultivada em diversos locais, com clima adequado, em todo o mundo (WALLANDER; ALBERT, 2000; VARGAS, 2000). A colonização espanhola levou as oliveiras para às Américas no século XVI. No século XVII foi introduzida no México, Peru, Chile, Argentina, Estados Unidos e Jamaica e, posteriormente, no Uruguai e Brasil (WREGE *et al.*, 2015). No Brasil são conhecidas apenas 15 espécies, distribuídas em 7 gêneros, e atualmente existem áreas de plantio nos estados do Rio Grande do Sul e Minas Gerais com relevância na sua produção (WREGE *et al.*, 2009; WREGE *et al.*, 2015).

Existem seis subespécies naturais: subsp. *europaea*, na bacia do Mediterrâneo; subsp. *laperrinei*, na região do Saara; subsp. *cuspidata*, na África do Sul, Sudeste Asiático, China e Arábia; subsp. *maroccana*, no Marrocos; subsp. *cerasiformis*, no arquipélago da Madeira; e subsp. *guanchica*, nas Ilhas Canárias (VARGAS, 2000). Contudo, segundo outras fontes, apenas as subespécies *cuspidata* (azeitona africana) e *europaea* (azeitona europeia) são aceitas (ITIS, 2021). Duas variedades ocorrem dentro da subsp. *europaea*: a oliveira cultivada (var. *europaea*) e a oliveira selvagem (var. *sylvestris*), conhecida como oleaster (CAVACA *et al.*, 2020).

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma angiospérmica dicotiledónea, da família das Oleáceas, a mesma família a que pertence o freixo, o ligustro e o lilás (OLISSUL, 2021). É curta e espessa, podendo ir de arbustos à árvores de até 10 metros de altura, seu tronco possui grande diâmetro e é tipicamente dobrado e retorcido. Suas folhas são verdes-acinzentadas, ligeiramente caídas, lanceoladas e com um pequeno bico terminal (HASHMI *et al.*, 2015). O fruto da oliveira é a azeitona, uma drupa ovóide ou sub-ovóide com dimensões que variam de 1,0 a 4,0 cm de comprimento e 0,6 a 2,0 cm de largura. Possui apenas uma semente e é composto de três tecidos fundamentais: endocarpo (caroço), mesocarpo (polpa) e exocarpo (pele) (RAPOPORT, 1998).

As plantas são uma das fontes mais importantes de produtos bioativos naturais (CAVACA *et al.*, 2020). Os polifenóis constituem um dos grupos de substâncias mais comuns

e difundidos nas plantas com flores, e são considerados os metabólitos secundários envolvidos na defesa química contra predadores (FERRAZZANO *et al.*, 2011). A *Olea europaea* L. é conhecida por sua capacidade de produzir uma matéria orgânica contendo uma alta proporção de biofenóis (RANALLI *et al.*, 2006), estes compostos incluem um grupo principal de metabólitos secundários, que se distinguem por sua solubilidade em água e alto peso molecular (CAVACA *et al.*, 2020). São considerados de grande importância fisiológica e morfológica nas plantas, apresentando uma riqueza de variedade estrutural e diversidade de atividades-chave, que culminam na reatividade ao ataque de patógenos e resposta a injúrias de insetos (JAPÓN-LUJÁN; LUQUE-RODRÍGUEZ; LUQUE DE CASTRO, 2006).

Existem mais de 100 biofenóis diferentes relatados em quase todas as partes da oliveira (OBIED *et al.*, 2007), sendo que a composição e concentração de biofenóis da oliveira varia entre seus produtos (frutos, óleo, folhas e resíduos) e tecidos (polpa e caroço) (OBIED *et al.*, 2012). Região de cultivo, condições climáticas e época do ano, variações da composição do solo e sua adubação, uso de substâncias para fertilização foliar, diversidade de cultivares, e estágio da planta são fatores que determinam grande variação química na *Olea europaea* L. (CAMPOEL *et al.*, 2001; CAMPOEL *et al.*, 2003; FLAMINI *et al.*, 2003). A forma de coleta da planta, os métodos de extração e o tipo de extrato, também são responsáveis por enorme variação de substâncias químicas (SIMÕES *et al.*, 2000).

No fruto os compostos fenólicos encontrados são: flavanóides (luteolina 7-*O*-glicosídeo, luteolina 5-*O*-glucosídeo, apigenina 7-*O*-glicosídeo), ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico, ácido ferúlico), álcoois fenólicos (3,4-DHPEA, *p*-HPEA) e secoiridóides (oleuropeína, ligstrosídeo, nuzhenide) (CAVACA *et al.*, 2020). As folhas da oliveira contêm secoiridóides (oleuropeína, ligstrosídeo, dimetiloleuropeína e oleosídeo), flavonóides (apigenina, caempferol, luteolina) e compostos fenólicos (ácido cafeico, tirosol, hidroxitirosol) (RAHMANIAN *et al.*, 2015). Tanto na azeitona verde (GHANBARI *et al.*, 2012) quanto nas folhas da oliveira, o principal secoiridóide identificado é a oleuropeína (CAVACA *et al.*, 2020).

A *Olea europaea* L. ganhou popularidade no mercado global de nutracêuticos devido a uma gama de alegados atributos de saúde, tradicionalmente utilizados no tratamento de um amplo espectro de doenças (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015). As indicações terapêuticas na medicina tradicional apontam para sua utilização na redução de glicemia, do colesterol e de ácido úrico. Sendo empregada no tratamento de diabetes, hipertensão, inflamação, diarreia, infecções do trato respiratório e urinário, doenças gástricas e intestinais,

asma e reumatismo (HASHMI *et al.*, 2015). A oleuropeína tem sido apontada como responsável pela maioria dos atributos terapêuticos da planta (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015; ÖZCAN; MATTHÄUS, 2017).

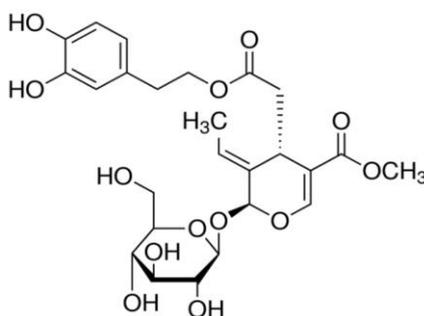
3.2 Oleuropeína

3.2.1 Química

A oleuropeína está incluída em um grupo específico de compostos semelhantes à cumarina, os secoiridóides, e é o biofenol mais abundante nas folhas da oliveira (SOLER-RIVAS; ESPÍN; WICHERS, 2000). Bourquelot e Vintilesco (1908) (*apud* ERBAY; ICIER, 2010) detectaram, pela primeira vez, a presença da oleuropeína em azeitonas, porém sua estrutura química só foi atribuída por Panizzi *et al.* em 1960 (*apud* ERBAY; ICIER, 2010).

A oleuropeína é um éster de 2'-(3',4'-dihidroxifenil) etanol (hidroxitirosol) e possui esqueleto oleosídico comum aos glicosídeos secoiridóides da *Oleaceae* (SOLER-RIVAS, 2000). Possui estereocentro em C-5 com configuração (S) e ligação dupla exocíclica 8,9 com configuração (E), característica dos secoiridóides (CAVACA *et al.*, 2020). A biossíntese da oleuropeína ocorre por meio de uma ramificação na via do mevalonato a partir do metabolismo secundário, resultando na formação de oleosídeos (DAMTOFT; FRANZYK; JENSEN, 1992). Destes compostos, são derivados os secoiridóides DAMTOFT; FRANZYK; JENSEN, 1993).

Figura 1 – Estrutura química da oleuropeína



Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2021 (Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/united-states.html> Acesso em: 02 fev. 2021).

3.2.2 Atividades farmacológicas da oleuropeína

A oleuropeína é responsável pela maioria dos atributos do extrato de folha de oliveira, sendo conhecida por suas propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo anticâncer, cardioprotetora, neuroprotetora, gastroprotetora, hepatoprotetora, antidiabética, antiobesidade, radioprotetora, antioxidante e antimicrobiana (contra bactérias, vírus, fungos e alguns parasitas) (JUVEN; HENIS, 1970; FLEMING *et al.*, 1973; GOURAMA *et al.* 1989; TRANTER; TASSOU; NYCHAS, 1993; TASSOU; NYCHAS, 1995; BISIGNANO *et al.*, 1999; McDONALD *et al.*, 2001; TUCK; HAYBALL, 2002; MARKIN *et al.*, 2003; KORUKLUOGLU *et al.*, 2004; MICOL *et al.*, 2005; MELLO; PINHEIRO, 2012; HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015; ÖZCAN; MATTHÄUS, 2017). Essas propriedades são em grande parte atribuídas aos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios presumíveis (CICERALE; LUCAS; KEAST, 2012; HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015; ÖZCAN; MATTHÄUS, 2017;). A Tabela 1 apresenta alguns estudos farmacológicos conduzidos na possível comprovação dos efeitos benéficos da oleuropeína.

Tabela 1 – Estudos farmacológicos conduzidos em modelos experimentais utilizando a oleuropeína

Modelo/ensaio	Efeitos	Autor
Ratos machos adultos de Sprague Dawley	Efeito antioxidante pela eliminação de ROS	Castillo <i>et al.</i> , 2010
Ratos machos adultos de Wistar; diabetes induzida por aloxana	Efeitos antidiabéticos e antioxidantes	Alirezai <i>et al.</i> , 2012
Ratos machos adultos de Wistar	Atividades antidiabética e antioxidante	Jemai <i>et al.</i> , 2009
Coelhos Nova Zelândia machos	Efeito hipoglicemiante e antioxidante	Al-Azzawie <i>et al.</i> , 2006
Fêmeas de camundongo C57BL/6; câncer colorretal induzido por azoximetano (AOM)/sulfato de dextrano de sódio (DSS)	Proteção contra câncer colorretal; supressão do crescimento e multiplicidade de tumores do cólon	Giner <i>et al.</i> , 2015
Modelo de infecção por leishmaniose visceral em Camundongos BALB/c infectados com <i>L. donovani</i>	Depleção de >95% do parasita no fígado e baço após 6 semanas	Kyriazis <i>et al.</i> , 2013

Continua

Tabela 1 – Estudos farmacológicos conduzidos em modelos experimentais utilizando a oleuropeína Continuação

Modelo/ensaio	Efeitos	Autor
10 mulheres saudáveis de 20-30 anos com pele Fitzpatrick tipos II e III	Efeito calmante no tratamento do eritema induzido por UVB	Perugini <i>et al.</i> , 2008
Homens de meia idade com sobrepeso	Aumento da sensibilidade à insulina	Bock <i>et al.</i> , 2013
Células FL83B normais de hepatócitos de camundongo; Células HepG2 e FL83B	Diminuição do tamanho do número de gotículas de lipídios em células tratadas com ácido graxo livre e redução do acúmulo de triglicerídeos intracelulares	Hur <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus cereus</i> CECT 148; <i>B. subtilis</i> CECT 498; <i>Staphylococcus aureus</i> ESA 7; <i>Escherichia coli</i> CECT 101; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 108; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESA 8; <i>Candida albicans</i> CECT 1394; <i>Cryptococcus neoformans</i> ESA 3.	Atividade antimicrobiana	Pereira <i>et al.</i> , 2007
Sangue total de 11 voluntários saudáveis do sexo masculino	Inibição da ativação plaquetária pela eliminação de H ₂ O ₂ produzido na cascata do metabolismo do ácido araquidônico que leva à agregação plaquetária	Singh <i>et al.</i> , 2008
Células HeLa de carcinoma cervical humano	Atividade anticancerígena	Yao <i>et al.</i> , 2014
Linhagem de células de câncer de mama	Morte celular apoptótica de células MCF-7 de câncer de mama humano	Han <i>et al.</i> , 2009
Linhagens celulares de câncer de mama humano (MCF-7 e T-47D)	Efeitos antiproliferativos e antioxidantes	Bulotta <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Adaptado de HASHMI *et al.*, 2015.

O acúmulo de radicais livres nos lipídios da membrana celular desempenha um papel importante em diversos distúrbios patológicos, incluindo aterosclerose, câncer, envelhecimento, artrite reumatoide e inflamação (SAHIN; BILGIN; DRAMUR, 2011). A oleuropeína possui uma estrutura orto-diafenólica (catecólica), que é conhecida por sua capacidade de eliminar radicais livres, atuando no tratamento de algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015). A comprovação dessa característica foi estabelecida por meio de testes *in vivo* e *in vitro*. Nestes ensaios, a capacidade da oleuropeína e extratos ricos em oleuropeína de eliminar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) se mostrou maior do que o antioxidante sintético BHT (hidroxitolueno butilado) (BOUAZIZ *et al.*, 2008; ZBIDI *et al.*, 2009; ACHAT *et al.*, 2012; MANCEBO-CAMPOS; SALVADOR; FREGAPANE, 2014). A prevenção da formação de radicais livres pela oleuropeína, pode estar relacionada a sua habilidade de quelar íons metálicos, como Cu e Fe, que catalisam reações de geração de radicais livres, bem como sua capacidade de inibir diversas enzimas inflamatórias (VISIOLI; POLI, 2002). Tanto sua capacidade de eliminação de radicais livres, quanto suas atividades quelantes de metais parecem ser responsáveis pela capacidade da oleuropeína de proteger as membranas da oxidação lipídica iniciada por metal (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015).

A inflamação é uma resposta protetora essencial e altamente orquestrada induzida por lesão ou infecção do tecido (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015). Foi demonstrado que a oleuropeína exibe um efeito anti-inflamatório que pode estar relacionado, pelo menos em parte, às suas propriedades antioxidantes (QUIÑONES; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2013). Domitrović e colaboradores (2012) relataram efeito anti-inflamatório da oleuropeína, propondo que este é mediado pela inibição do NF- κ B, e sua translocação para o núcleo, ciclooxigenase-2 (COX-1), caspase-3 e iNOS. Foi demonstrado que a oleuropeína atenua as principais citocinas inflamatórias, como NF- κ B, TNF- α , IL-8 β e prostaglandina E₂, além de restaurar a expressão e atividade da proteína quinase A no pulmão de camundongos com pleurisia induzida por carragenina e em um modelo experimental de lesão da medula espinhal em camundongos (IMPELLIZZERI *et al.*, 2011; IMPELLIZZERI *et al.*, 2012).

3.2.3 Toxicidade da oleuropeína

Se do ponto de vista da comprovação de atividades farmacológicas e potenciais efeitos terapêuticos é possível encontrar farta investigação sobre a *Olea europaea* e seu composto fenólico mais abundante, a oleuropeína, o mesmo não pode ser dito com relação às pesquisas

sobre sua toxicidade. Mesmo com suas atividades biológicas bem reconhecidas e seu amplo uso tradicional como medicamento e alimento, a toxicidade sistêmica e as avaliações de segurança da oleuropeína e/ou extratos ricos em oleuropeína são muito limitadas (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015).

Christian e colaboradores (2004), avaliaram o potencial tóxico de HIDROX[®] (Hydrolyzed Aqueous Olive Pulp Extract, OPE) e determinaram a NOAEL (no-observable-adverse-effect-level) em camundongos como o limite de dose para administração oral de 2000 mg/kg. Em ratos, a administração de 1000, 1500 e 2000 mg/kg/dia, durante 90 dias, produziu pequena redução de peso corporal. Não foram observadas alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas, peso de órgãos nem alterações macroscópicas à necropsia. Os animais não foram afetados adversamente pelo tratamento no que se refere as variáveis de acasalamento, fertilidade, parto e desenvolvimento das ninhadas. No estudo com ratas gestante que receberam OPE nas doses de 1000, 1500 e 2000 mg/k/dia entre o sexto e o vigésimo dia de gestação, os resultados demonstraram que os níveis plasmáticos de gestantes e lactantes, comparados com ratas não gestantes, não mostraram diferenças; a passagem placentária foi mínima e não foram identificados níveis quantificáveis no leite e no plasma dos filhotes (CHRISTIAN *et al.*, 2004).

É geralmente aceito que os extratos de folha de oliveira sejam bastante seguros (KENDALL *et al.*, 2009). Entretanto, um estudo recente conduzido por Arantes-Rodrigues *et al.* (2011), demonstrou que a suplementação com extrato de folha de oliveira em altas doses (0,5 e 0,75% da dieta, durante 14 semanas) induz lesões hepáticas significativas, hiperplasia dos ductos biliares e colestase. Além disso, a bioenergética hepática foi afetada negativamente, conforme demonstrado pela diminuição significativa no controle da razão respiratória devido a um efeito desacoplador (ARANTES-RODRIGUES *et al.*, 2011). O número limitado de estudos de segurança pré-clínica para extratos de folhas da *Olea europaea* L. e dados toxicológicos concernentes à oleuropeína, restringem a possibilidade de seu uso (EMA, 2011).

3.2.4 Avaliação toxicológica

Para que fitoterápicos e fármacos sejam produzidos ou disponibilizados no mercado para consumo, é necessário uma avaliação rigorosa de suas características. Para tal, devem ser realizados testes que determinem suas atividades toxicológicas e seu potencial mutagênico (SILVA *et al.*, 2003). Os principais protocolos seguidos são os emitidos pela Europa através da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) e pelos Estados Unidos da América através do *Food and drug Administration* (FDA) (SILVA *et al.*, 2003).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é o órgão responsável pela regulamentação do registro de medicamentos fitoterápicos para uso humano e prevê a realização de estudos de toxicidade pré-clínica. Os ensaios de toxicidade reprodutiva, são fundamentais quando o medicamento for indicado para gestantes ou para administração de longa duração, o órgão regulamentador indica métodos padronizados para os estudos de toxicidade pré-clínica para fitoterápicos, incluindo toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas e ensaios de genotoxicidade e toxicidade tóxica (ANVISA, 2004).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é o órgão responsável pelo registro de medicamentos para uso veterinário, e apresenta as mesmas exigências quanto à avaliação toxicológica prevista em sua normativa Decreto 5.053 de 2004 (BRASIL, 2004).

3.2.4.1 Testes sobre toxicidade reprodutiva

A reprodução pode ser descrita como um processo biológico que garante a continuidade das espécies, propiciando a passagem do material genético para gerações seguintes (MELLO, 2007). A avaliação toxicológica reprodutiva compreende um estudo complexo, pois o ciclo reprodutivo não limita-se apenas a concepção, gestação e nascimento, mas tem início com a produção de gametas, continuando pela fertilização e desenvolvimento embriofetal, nascimento e desenvolvimento pós-natal, até a maturidade sexual, onde o descendente se torna um adulto capaz de procriar (MELLO, 2007).

Os testes de avaliação da toxicidade reprodutiva, geralmente compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção (toxicidade crônica), durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento, continuamente até sua maturação sexual (toxicidade Peri e Pós-natal), de maneira a abranger igualmente todas as fases do ciclo reprodutivo, detectando, assim, diferentes tipos de agravos que possam vir a afetá-las (LÊMONICA, 2001).

Os estudos comumente utilizados para avaliação da toxicidade reprodutiva são divididos em três segmentos, adaptando-se das normas da ANVISA com as normas internacionais guiadas pela *Environmental Protection Agency* (EPA) e recomendadas pela OECD e FDA, são eles:

- Segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva” onde são avaliados os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento;

- Segmento II “Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade” que caracteriza-se pelo estudo de teratogenicidade, com exposição da progênie durante a fase de organogênese;
- Segmento III “Toxicidade peri e pós-natal” através da avaliação de efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação

Para estudos de toxicologia, frequentemente utilizam-se ratos Wistar, um estoque de ratos albinos que são indicados por serem animais dóceis e possuírem excelente desempenho reprodutivo. Os machos atingem a maturidade sexual logo após a puberdade (entre 60 e 75 dias de vida), sua fertilidade máxima encontra-se entre 100 e 300 dias, e a senescência reprodutiva ocorre aproximadamente aos 360 dias de idade (EBISUI, *et al.*, 2009).

A maneira mais adequada de apontar os efeitos reprodutivos induzidos por xenobióticos é investigar todos os parâmetros possíveis. Existem diversos estudos e há vários anos os investigadores monitoram, com maior frequência, o comportamento animal quando se estudam os efeitos reprodutivos de substâncias exógenas (CHAHOU; FAQI, 1998; FAQI *et al.*, 1998).

3.2.4.2 Desenvolvimento dos filhotes

Em ratos, o equivalente ao terceiro trimestre gestacional humano ocorre após o nascimento, ou seja, o período pós-organogênese é extra-uterino, sendo os 7-10 primeiros dias de vida pós-natal o período que representa o maior crescimento neuronal (WEINBERG *et al.*, 2008). Por possuírem uma menor capacidade metabólica e excretora, além da ausência de muitos mecanismos de retroalimentação do sistema endócrino, os indivíduos expostos durante períodos críticos de desenvolvimento são mais vulneráveis à ação de substâncias químicas (ZENICK & KLEGG, 1989); podendo causar retardo no crescimento e anormalidades funcionais (WILSON, 1965; BERNARDI, 2006; GÓRNIK; SPINOSA; BERNARDI, 2008).

O período neonatal (fase final do período perinatal) tem seu início no nascimento da prole, sendo finalizado com o término da lactação. É nesse período que ocorre a maturação funcional e o ganho de peso corporal (BROLESE, 2009). A mãe é a primeira fonte de conforto térmico, alimentação e limpeza, determinando primariamente o desenvolvimento da arquitetura do cérebro após o nascimento (CASTRO, 2006). Ratos de laboratório nascem pesando entre 5 – 7g no dia zero, com os olhos fechados e a cavidade do ouvido obstruída por pele; as narinas encontram-se abertas para a respiração e os animais possuem dente de leite, porém, os dentes

incisivos ainda não nasceram, as patas traseiras e dianteiras são bem formadas, mas os filhotes não têm capacidade de ficar em pé ou agarrar (GERRISH; ALBERTS, 1995).

Em animais, utilizam-se alguns testes importantes para determinar se há alteração quanto ao peso, desenvolvimento, maturação e comportamento dos filhotes pela exposição a substâncias administradas (ABEL; DINTCHEFF, 1978). Investiga-se alterações em testes que compreendem respostas reflexas, de orientação, de força, atividade locomotora e ansiedade, além do registro de peso, observação da abertura de olhos, erupção dos dentes incisivos, e características reprodutivas como abertura do canal vaginal e a separação prepucial (BROLESE, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Insumos

O composto utilizado no presente trabalho foi adquirido de forma comercial da empresa Chinesa XI'NA GREEN SOURCE CO., LTD., através de um extrato em pó das folhas de *Olea europaea* L. com concentração de 40% de oleuropeína e umidade de 3,21% lote número OE180512 (Anexo 1). A oleuropeína comercial foi analisada pelo Departamento de Produção de Matéria Prima, Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia – UFRGS. A amostra foi analisada por diferentes ferramentas espectroscópicas para testar ou confirmar o grau de pureza declarado pelo fornecedor (Anexo 2).

4.2 Protocolo Experimental para Toxicidade Peri e Pós-Natal (Segmento III)

4.2.1 Animais

Foram avaliados 492 filhotes do projeto intitulado “Avaliação da Toxicidade Crônica e Reprodutiva (Segmento I) da oleuropeína em Ratos Wistar”, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, projeto previamente aprovado pelo CEUA - UFRGS, Protocolo número 37279/2019.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL) em condição constante de umidade (30-70%), temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 7h00min às 19h00min), e alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum*. Os machos e fêmeas foram mantidos em grupos de quatro animais por caixa de polipropileno medindo 40 x 33 x 18 cm contendo maravalha, visando proporcionar melhor bem-estar aos animais, tendo em vista que a espécie utilizada no estudo é sociável e vive em grupo.

O alojamento, manejo e eutanásia dos animais seguiram a Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008) e o Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009 (BRASIL, 2009), e os princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016). Bem como, a Resolução Normativa Nº 37, de 15 de fevereiro de 2018 e as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2018). Foram observadas, também, as orientações da Resolução Nº 1.000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012) e o “Guia brasileiro de boas práticas

para eutanásia em animais”, elaborado pela Comissão de Ética, Bioética e Bem-estar Animal do CFMV (2012).

Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRGS, Porto Alegre, RS, número 37284 (Anexo 3).

4.2.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, baseados nos grupos de tratamento da geração paterna avaliados no projeto “Avaliação da Toxicidade Crônica e Reprodutiva (Segmento I) da oleuropeína em Ratos Wistar”, anteriormente citado. O delineamento experimental utilizado no tratamento dos progenitores foi constituído de três doses espaçadas geometricamente, conforme recomendado pela OECD/OCDE (2001) e FDA (1994). Segundo a OECD/OCDE (2001), deve ser escolhida a menor dose que não tenha produzido qualquer toxicidade materna ou no desenvolvimento fetal (NOAEL), a dose intermediária que tenha apresentado mínimos efeitos tóxicos observáveis e a dose mais alta que tenha produzido alguma toxicidade (sinais clínicos ou diminuição do peso corporal), mas que não tenha causado sofrimento grave aos animais. As doses a testadas (500 mg/kg/dia, 1000 mg/kg/dia e 2000 mg/kg/dia) foram definidas com base no estudo realizado por Christian *et al.* (2004), onde foi estabelecida a dose NOAEL de 2000 mg/kg/dia para estudos com doses repetidas em ratos tratados com extrato aquoso de polpa de oliva.

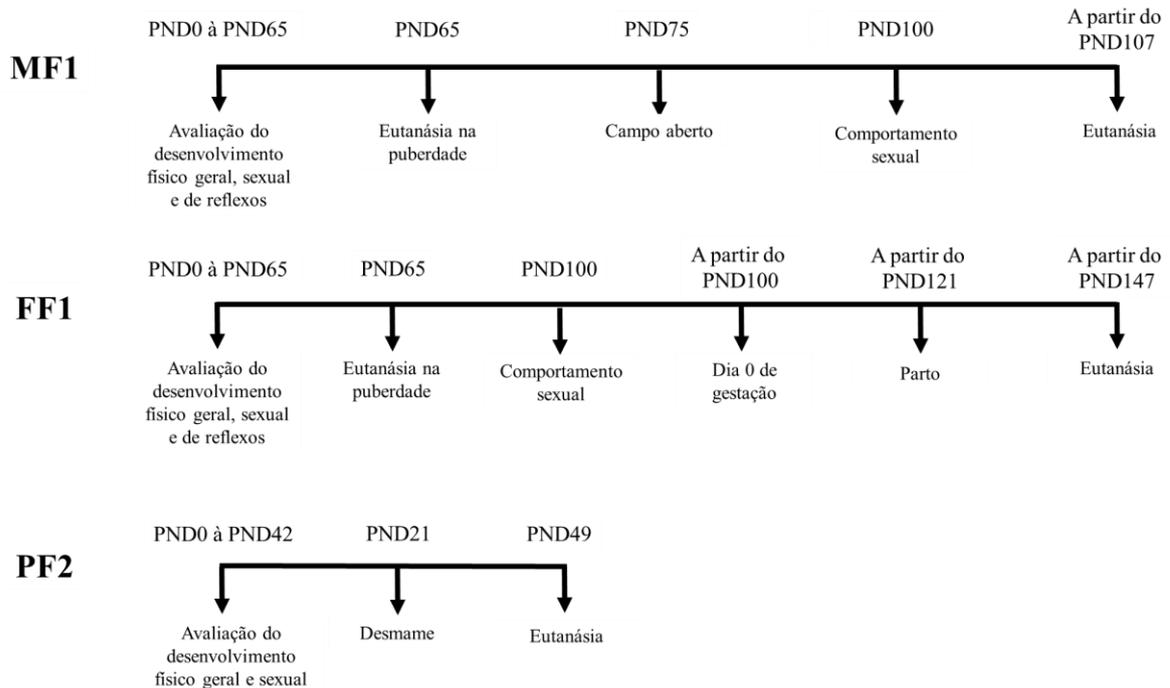
O volume administrado nos progenitores foi idêntico em todos os grupos. Todos os animais foram tratados diariamente, por via oral, através de sonda gástrica flexível em volume correspondente a 10 ml/kg. A diferença foi a dose de oleuropeína na solução administrada, que foi de 2000 mg/kg/dia, 1000 mg/kg/dia e 500 mg/kg/dia.

Os animais foram separados em quatro grupos experimentais, conforme tratamento dos progenitores:

- GRUPO CN. **Controle negativo** – progenitores tratados com água destilada.
- GRUPO I. **Dose 1** – progenitores tratados com 2000 mg/kg/dia de oleuropeína diluída em água destilada.
- GRUPO II. **Dose 2** – progenitores tratados com 1000 mg/kg/dia de oleuropeína diluída em água destilada.
- GRUPO III. **Dose 3** – progenitores tratados com 500 mg/kg/dia de oleuropeína diluída em água destilada.

Na Figura 2 podemos observar, de forma ilustrativa, uma linha do tempo do experimento.

Figura 2 – Linha do tempo do experimento. Procedimentos realizados nos animais do segmento III (MF1 - Machos da geração F1; FF1 - Fêmeas da geração F1; PF2 – Progenie geração F2).



Fonte: o próprio autor.

4.2.3 Avaliação geral da prole

Os animais foram observados desde o dia do nascimento (0 PND). Foram sexados e selecionados, aleatoriamente, oito filhotes por fêmeas, mantendo a proporção de quatro machos e quatro fêmeas, quando possível. Os filhotes no dia do nascimento, foram marcados individualmente com tinta nanquim por via subcutânea nos coxins plantares. Foi mensurado o peso dos filhotes individualmente nos dias PND0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 63. Cada filhote foi avaliado quanto ao desenvolvimento físico e geral como recomenda OECD 416 (2001) para as seguintes características: dia do aparecimento da penugem (primeira detecção de penugem), dia do descolamento dos pavilhões auriculares (quando ambos estavam descolados), dia do desenvolvimento do pelo, dia da erupção dos dentes incisivos (quando os dois incisivos já haviam sofrido erupção), dia da abertura dos olhos (quando ambos estavam completamente abertos), dia da separação prepucial e o dia de abertura vaginal (OECD, 2001). A observação dessas características são de extrema importância, a fim de verificar possíveis alterações no desenvolvimento físico e reprodutivo dos animais (BROLESE, 2009).

4.2.4 Desenvolvimento físico geral

Os reflexos dos filhotes foram avaliados individualmente e de acordo com adaptações de Castro *et al.* (2000) e Castro (2006). Do PND 2 ao PND5 foi avaliado o Reflexo de Endireitamento em superfície, onde cada animal foi colocado em decúbito dorsal e foi cronometrado o tempo gasto para ele voltar ao decúbito ventral. O animal, ao virar-se, deve ficar com as quatro patas espalmadas na superfície. Do PND7 ao PND10 foi avaliada a Geotaxia negativa, onde o animal foi colocado com as quatro patas em um plano inclinado de 30°, com a cabeça voltada para o lado mais baixo e foi avaliada a latência para os animais voltarem à posição oposta, reorientando o corpo com um giro de 180°. Do PND14 ao PND17, os animais foram seguros pela cauda e encorajados a agarrar-se com os dois membros anteriores em uma barra cilíndrica, ficando suspensos; foi cronometrado o tempo que o animal conseguiu ficar suspenso, avaliando assim, a Resposta de Agarrar.

Após o desmame (21° dia de lactação), os animais foram colocados em caixas coletivas até o final do experimento. No PND65 um macho e uma fêmea de cada ninhada foram selecionados aleatoriamente e eutanasiados para a avaliação de peso de órgãos. Nos machos ainda foi realizada a coleta de testículos, epidídimos e ductos deferentes para verificar a produção espermática e possíveis alterações morfológicas nos espermatozoides.

4.2.5 Eutanásia dos machos na puberdade

A partir do 65° dia de vida, aleatoriamente, foi selecionado um macho de cada uma das ninhadas para ser eutanasiado. Para a avaliação das variáveis relacionadas à toxicidade reprodutiva, o protocolo de eutanásia dos machos púberes da primeira geração seguirá a eutanásia dos machos da geração paterna, avaliado no projeto “Avaliação da Toxicidade Crônica e Reprodutiva (Segmento I) da oleuropeína em Ratos Wistar”, anteriormente citado. O método de eutanásia utilizado foi o inalatório e o agente anestésico foi o isoflurano. Os animais foram colocados em uma gaiola fechada, juntamente com um recipiente contendo algodão embebido com isoflurano. O algodão foi mantido em um recipiente fechado afim de que os animais não tivessem contato direto com o líquido do algodão (FANTONI *et al.*, 2011; CFMV, 2012; CONCEA, 2018). Após a eutanásia, os animais foram submetidos à celiotomia. Rins, fígado, baço e coração foram removidos e avaliados em relação a possíveis alterações macroscópicas. A massa de cada órgão foi mensurada e relacionada com a massa corporal do

indivíduo. Os órgãos sexuais, testículos, epidídimos, ductos deferentes, próstata e vesícula seminal (esvaziada para pesagem) também sofreram o mesmo processo.

4.2.5.1 Avaliação espermática

As contagens espermáticas foram realizadas de acordo com o que foi previamente descrito por Piffer e colaboradores (2009) e Robb e colaboradores (1978). A túnica albugínea e os vasos principais de cada um dos testículos foram removidos, e cada testículo foi triturado e homogeneizado em 10 mL de NaCl 0,9% contendo 0,05% de Triton X-100, em triturador tecidual Fisaton 720® a uma velocidade de 600 rpm, durante 1 minuto. Os procedimentos de homogeneização e trituração, foram repetidos com a cauda de cada um dos epidídimos dos animais, previamente cortada com tesoura em pequenos pedaços.

O macerado resultante de cada testículo e de cada epidídimo foi acondicionado em microtubos individuais, sendo retirado de cada macerado, um volume correspondente a 100µL. Cada microtubo foi acrescido de 900µL de solução de NaCl 0,9%, chegando a um volume final de 1 mililitro.

Deste volume, foi realizada a contagem do número total de espermatozoides (cauda do epidídimo), e o número de espermátides por animal (testículo), sendo utilizada para tanto uma câmara de Neubauer, na qual foram contados os respectivos tipos celulares em 64 quadrados pequenos. A contagem foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40 vezes. O número de espermatozoides e sua produção diária foram determinados pelas fórmulas:

$$S = C \times FC \times V \text{ (espermatozoides)}$$

$$S = C \times FC \times V \div 6,1 \text{ (produção diária)}$$

Onde:

S = soma total por animal

C = número de espermatozoides ou espermátides contados

FC = fator câmara (1,250)

V = diluição (10^6)

Um ducto deferente de cada animal foi lavado com 1mL de solução de NaCl 0,9%, sendo obtida uma suspensão de espermatozoides. Uma pequena alíquota dessa suspensão (0,1mL) foi misturada com igual volume de eosina 2% e foi executado esfregaço em lâmina, para análise do percentual de alterações morfológicas de cabeça e cauda dos espermatozoides provenientes do ducto. Foram analisados 200 espermatozoides por animal em microscópio óptico com um aumento de 40 vezes.

4.2.6 Eutanásia das fêmeas na puberdade

A partir do 65º dia de vida, aleatoriamente, foi selecionada uma fêmea de cada uma das ninhadas para ser eutanasiada na puberdade. Para avaliação das variáveis relacionadas às toxicidades sistêmica e reprodutiva, o protocolo de eutanásia das fêmeas adultas da primeira geração seguiu o protocolo de eutanásia dos progenitores, avaliado no projeto “Avaliação da Toxicidade Crônica e Reprodutiva (Segmento I) da oleuropeína em Ratos Wistar”, anteriormente citado. O método de eutanásia utilizado foi o mesmo descrito para machos no item 4.2.5. A eutanásia ocorreu no dia do estro, confirmado por citologia vaginal. A coleta do lavado vaginal, foi realizada com uso de micropipeta contendo 10 µL de solução salina de cloreto de sódio a 0,9%. A ponteira foi introduzida superficialmente no orifício vaginal do animal, uma gota da solução salina foi coletada, aspirada e gotejada em lâminas de vidro. O esfregaço vaginal foi analisado em microscópio óptico em aumentos de 10 e 40 vezes. O estro se caracteriza pela presença de células queratinizadas e anucleadas.

Após a eutanásia os animais foram submetidos à celiotomia, foram removidos e inspecionados o fígado, baço, coração, rins, ovários e útero. Cada órgão foi pesado individualmente em balança analítica e seu peso relacionado com a massa corporal do indivíduo.

4.2.7 Teste de comportamento em campo aberto

No PND75, um macho de cada grupo teve seu comportamento testado através do teste de campo aberto com adaptações de Asano (1989). O teste consiste na mensuração das variáveis comportamentais dos filhotes aos 75 dias de idade, os mesmos foram colocados individualmente em uma arena circular de acrílico com 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, posicionado sobre uma plataforma de acrílico branco, subdividida em doze seções concêntricas. Cada animal foi alocado, delicadamente, no centro do aparelho e seu comportamento registrado em vídeo durante 5 minutos.

O teste foi realizado durante o ciclo claro e foram analisadas as seguintes categorias comportamentais: locomoção total (avaliada pelo número de seções que o animal cruzou com as quatro patas), permanência no centro da arena, “*rearing*” (permanência sobre duas patas traseiras investigando o ambiente) e quantidade de bolos fecais. No início e entre os testes, o aparato foi limpo com solução de etanol a 5%, com o objetivo de homogeneizar a condição experimental, eliminando possíveis odores deixados por outros animais.

4.2.8 Teste de comportamento sexual

O teste de comportamento sexual foi realizado no PND100 com adaptações de Felicio *et al.* (1989) e Chiavegatto *et al.* (1989). O comportamento sexual dos filhotes foi avaliado aos 100 dias de idade. Quinze casais não consanguíneos foram formados dentro de cada um dos grupos experimentais, como também no grupo controle negativo. Diariamente, durante o ciclo escuro, as fêmeas foram examinadas quanto à fase do ciclo estral mediante análise de citologia vaginal. As fêmeas em estro foram selecionadas para o acasalamento. Cada macho foi colocado individualmente, por 10 minutos para adaptação, em caixa acrílica (50cm³) contendo maravalha, sendo iluminada por uma lâmpada vermelha (15W). Em sequência, foi colocada a respectiva fêmea e o casal teve seu comportamento filmado por 30 minutos. Posteriormente, a fêmea foi avaliada quanto à presença de espermatozoides na citologia vaginal e/ou tampão vaginal. As fêmeas copuladas foram consideradas gestantes e colocadas em caixas individuais. O casal em que a fêmea não manifestou evidências de cópula, retornou à caixa de origem e foi permitida mais uma oportunidade, por ocasião do próximo estro.

Os parâmetros avaliados para machos foram: latência para a primeira monta, latência para a primeira intromissão, latência para a primeira ejaculação, número de intromissões até a primeira ejaculação, número de montas incompletas até a primeira ejaculação, total de montas incompletas e intromissões até a primeira ejaculação, total de montas incompletas e intromissões no tempo total de observação, latência para a primeira monta após a primeira ejaculação, número de ejaculações. O parâmetro avaliado para fêmeas foi: receptividade da fêmea, medida pelo coeficiente de lordose (divisão do número de lordoses pelo número de montas).

4.2.9 Análise dos testes de comportamento

Os testes de campo aberto e comportamento sexual foram registrados usando câmera de vídeo digital e analisados através do software Behavsoft[®] (2019). Este programa permite uma análise precisa do comportamento em tempos selecionados pelo usuário, através de uma única interface usando comandos de atalho do teclado (COSTA *et al.*, 2015).

4.2.10 Avaliação de variáveis das fêmeas adultas e progênie

As fêmeas utilizadas no teste de comportamento sexual foram avaliadas quanto ao seu desempenho reprodutivo. Foi analisada a variação de peso das fêmeas durante o período

gestacional e lactacional, peso relativo dos órgãos e índices reprodutivos. As ninhadas descendentes destas progenitoras foram acompanhadas do PND0 até o PND42, e tiveram seu desenvolvimento físico e geral avaliados.

4.2.10.1 Parâmetros Reprodutivos

Os indicadores reprodutivos avaliados nas fêmeas foram: n° de fêmeas gestantes, n° de filhotes nascidos vivos, n° de filhotes nascidos, n° de fêmeas copuladas que gestaram e n° de filhotes por ninhada, com esses dados foram calculadas as seguintes taxas reprodutivas, de acordo com *U.S. Environmental Protection Agency, USEPA (1996)*:

- Taxa de acasalamento = $\frac{\text{n° de fêmeas com espermatozoides no esfregaço vaginal}}{\text{n° de fêmeas acasaladas}} \times 100$
- Taxa de gestação = $\frac{\text{n° de fêmeas gestantes com filhotes}}{\text{n° de fêmeas espermatozóide lavado vaginal}} \times 100$
- Taxa de parto = $\frac{\text{n° de fêmeas paridas a termo}}{\text{n° de fêmeas prenhes}} \times 100$
- Taxa de natalidade = $\frac{\text{n° filhotes nascidos vivos}}{\text{n° total de filhotes nascidos}} \times 100$
- Taxa de perdas pós-implantação = $\frac{(\text{n° de sítios de implantação} - \text{n° de fetos nascidos})}{\text{n° total de sítios de implantação}} \times 100$
- Taxa de viabilidade = $\frac{\text{n° de filhotes vivos até o 4° dia de lactação}}{\text{n° de filhotes nascidos vivos}} \times 100$
- Taxa de desmame = $\frac{\text{n° de filhotes ao desmame}}{\text{n° de filhotes nascidos vivos}} \times 100$

4.2.10.2 Evolução da massa corporal gestacional e lactacional

As fêmeas adultas que foram acasaladas durante o teste de comportamento sexual foram acompanhadas durante a gestação e lactação até o desmame (21° dia de lactação) e tiveram a massa corporal avaliada semanalmente.

4.2.10.3 Eutanásia e coleta de órgãos

No 21° dia de lactação, as fêmeas foram eutanasiadas e tiveram seus órgãos coletados conforme descrito anteriormente no item 4.2.6, com vistas à avaliação de peso relativo e possíveis alterações macroscópicas.

4.2.10.4 Avaliação geral da prole

As progênies foram acompanhadas do PND0 até o PND42, e tiveram seu desenvolvimento físico e geral avaliados conforme descrito anteriormente no item 4.2.3.

4.2.11 Análise estatística

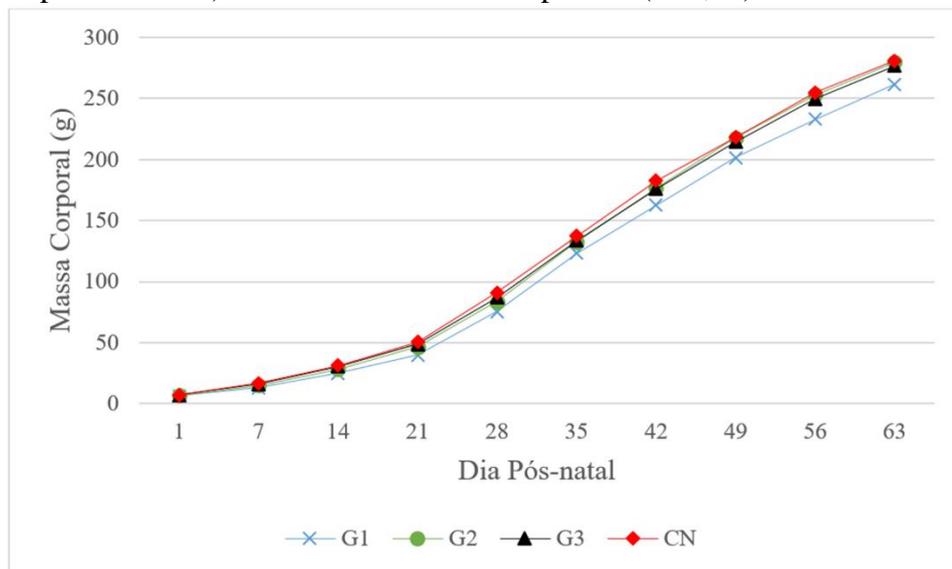
As variáveis em questão foram primeiramente submetidas a teste de normalidade (Kolmogorov–Smirnov). A análise estatística incluiu a análise de variância de uma via (ANOVA), ANOVA de medidas repetidas, Kruskal-Wallis e Teste de Fisher. As variáveis quantitativas seguiram o teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis. Todas as análises foram executadas usando o programa IBM SPSS statistics v.20 (2020) e WINPEPI (2011). Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor que 0,05 ($P < 0,05$). Os valores foram expressos como média e erro padrão da média (\pm EPM) ou mediana e percentis.

5 RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento ponderal

A Figura 3, apresenta a evolução da massa corporal da progênie de ratos e ratas tratados com oleuropeína em três concentrações (G1, G2 e G3) e um controle negativo (CN) durante o período de gestação e lactação. As ninhadas foram acompanhadas desde o dia 0 pós-natal (PND) até o 63 PND. Verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos e o grupo controle negativo ($P=0,05$).

Figura 3 – Evolução da massa corporal (g) individual da progênie exposta via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Os valores representam a média dos grupos ($n=104$, 88, 144 e 112, respectivamente). ANOVA de medidas repetidas ($P=0,05$).



5.2 Desenvolvimento físico e motor

Conforme exposto na Tabela 2, houve diferença estatisticamente significativa para o dia de descolamento de orelhas do grupo tratado com 500 mg/kg/dia (G3) de oleuropeína em comparação ao grupo controle negativo, o G3 demonstrou um atraso no desenvolvimento desta característica ($P<0,001$). Porém o mesmo grupo apresentou uma erupção de dentes incisivos precoce ($P=0,023$), em comparação a progênie exposta via útero e lactação a água destilada. Os grupos expostos as doses de 2000 mg/kg/dia e 1000 mg/kg/dia de oleuropeína abriram os olhos

mais tarde em comparação ao grupo controle negativo ($P < 0,01$). As demais características de desenvolvimento físico das ninhadas se manifestaram em períodos correspondentes aos do grupo controle negativo ($P > 0,05$). O tratamento com 2000 mg/kg/dia de oleuropeína acarretou em um retardo na separação prepucial da progênie em comparação ao grupo controle negativo ($P < 0,001$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa, no período de abertura do canal vaginal da progênie dos grupos tratados com oleuropeína em relação a progênie do grupo controle negativo.

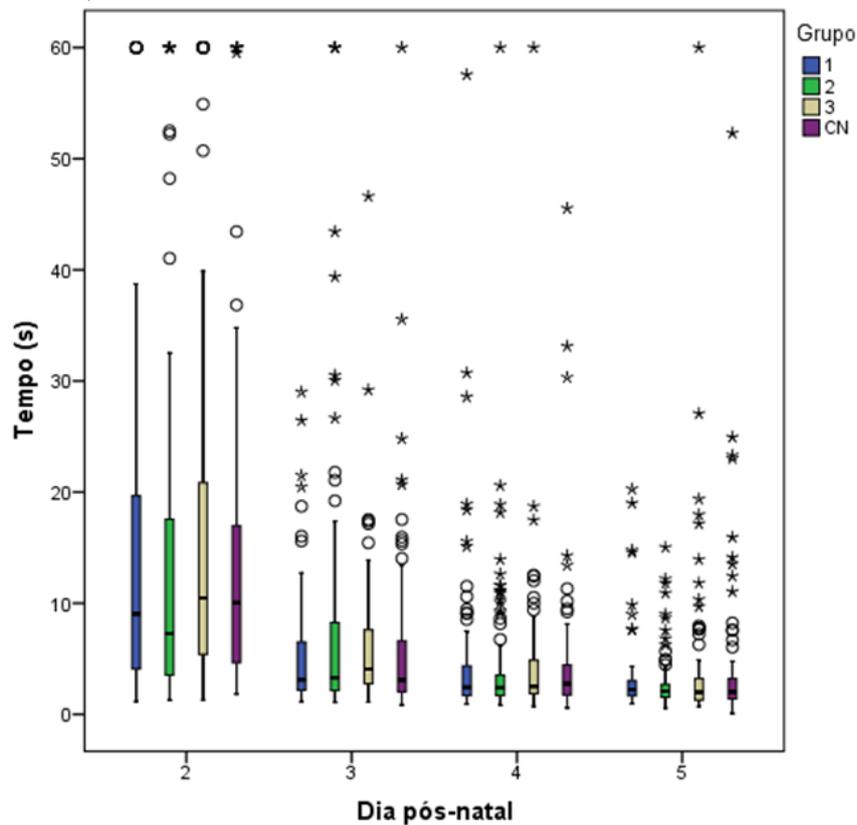
Tabela 2 – Características de desenvolvimento geral e sexual estimadas em dias (tempo), da progênie exposta via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em mediana e percentis. ($n = 104, 88, 144, 112$ respectivamente para ninhadas, 53, 44, 78, 56 para machos e 51, 44, 66, 56 para fêmeas respectivamente).

Características	GRUPOS			
	CN	G1	G2	G3
Descolamento de orelhas	3(2-3)	3	3(2-3)	3(3-4)*
Aparecimento da penugem	5	5	5	5
Aparecimento de pelos	8	8	8	8
Erupção de incisivos	11(10-11,75)	11(10-12)	11(10-12)	11(10-11)*
Abertura dos olhos	14(13-14)	14(14-15)*	14*	14(13-14)
Separação prepucial	40(39-40,5)	40(39-41,75)	41(40-42)*	41(39-41)
Abertura do canal vaginal	36(35-37)	36,5(34-37,75)	37(36-38)	36(35-38)

* Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), em relação ao grupo controle negativo (CN). Kruskal-Wallis, seguido de teste de Bonferroni.

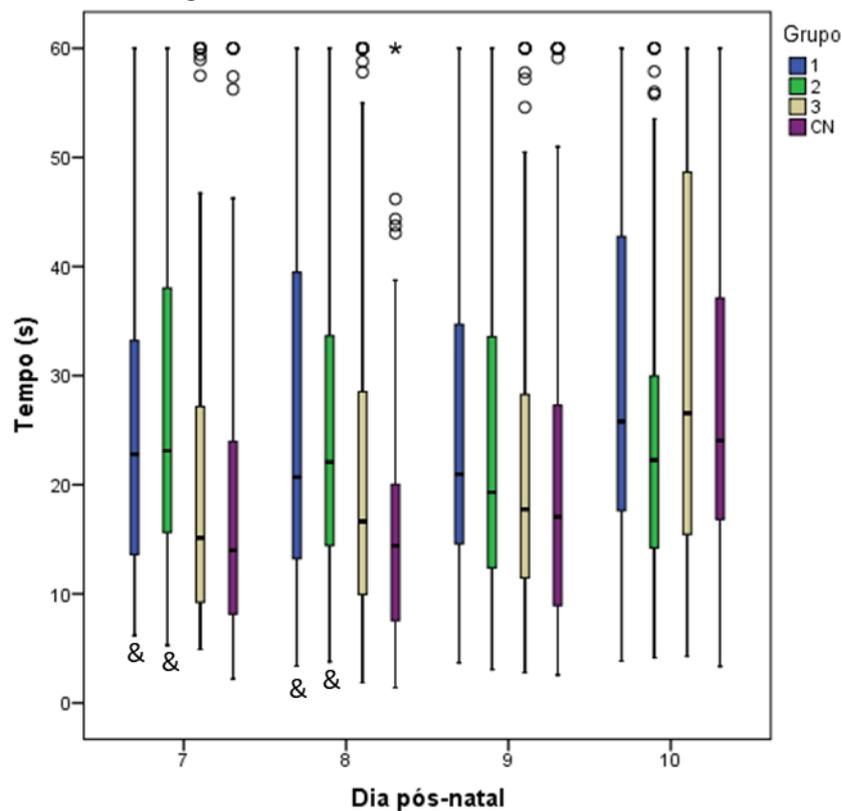
A partir do 2º PND os filhotes foram avaliados por testes de reflexos, a fim de estimar seu desenvolvimento motor. A Figura 4 mostra os resultados obtidos da avaliação do endireitamento em superfície da progênie exposta via útero e lactação a diferentes concentrações da oleuropeína. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo controle negativo ($P > 0,05$).

Figura 4 – Característica de desenvolvimento comportamental de acordo com avaliação de endireitamento em superfície, estimado em segundos (tempo), da progênie exposta via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em mediana e percentis ($n= 96, 88, 144$ e 112 , respectivamente). Kruskal-Wallis seguido de teste de Bonferroni ($P>0,05$).



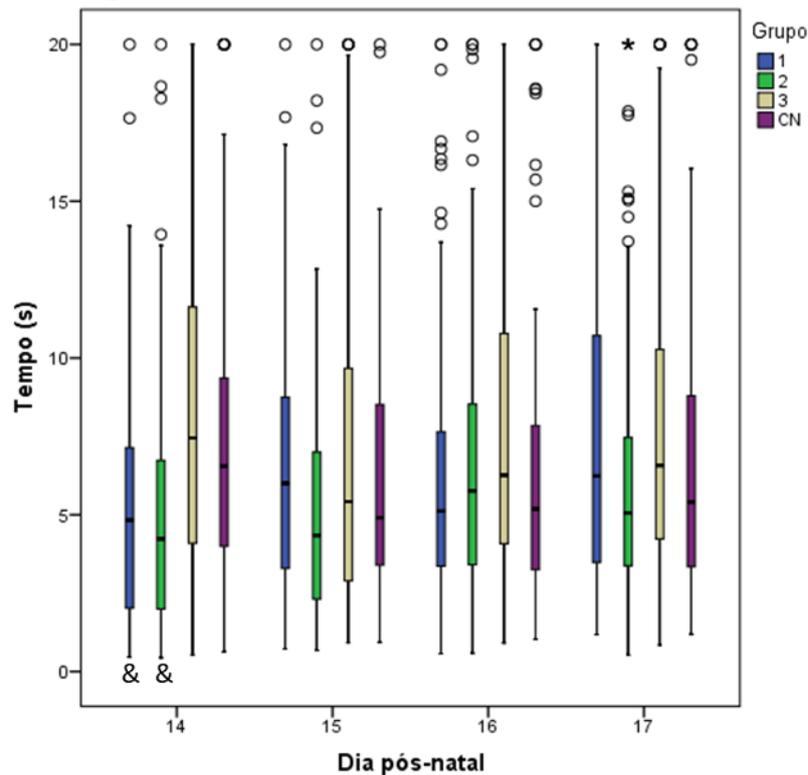
A geotaxia negativa foi avaliada no PND 7, 8, 9 e 10, demonstrando diferença estatisticamente significativa no PND 7 e 8 entre os grupos que foram expostos as maiores dosagens da oleuropeína (2000 mg/kg/dia e 1000 mg/kg/dia de oleuropeína) e o grupo controle negativo ($P<0,001$). Tanto os animais do grupo G1 quanto os do G2, demoraram mais para orientarem-se comparados ao grupo CN (Figura 5).

Figura 5 – Característica de desenvolvimento comportamental de acordo com avaliação de geotaxia negativa, estimado em segundos (tempo), da progênie exposta via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em mediana e percentis ($n=96, 88, 144$ e 112 , respectivamente). *Diferença estatisticamente significativa ($P<0,001$), em relação ao grupo controle negativo (CN). Kruskal-Wallis seguido de teste de Bonferroni.



A habilidade de “agarrar” é desenvolvida pelos ratos entre o dia 14 e o dia 17 pós-natal. Nossos resultados demonstraram que os animais expostos via útero e lactação as maiores dosagens da oleuropeína (G1 e G2) permaneceram menos tempo agarrados no PND 14 quando comparados ao grupo exposto a água destilada (Figura 6). Porém, essa diferença significativa não se manteve nos demais dias de realização do teste.

Figura 6 – Característica de desenvolvimento comportamental de acordo com avaliação de resposta ao agarrar, estimado em segundos (tempo), da progênie exposta via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em mediana e percentis ($n=96, 88, 144$ e 112 , respectivamente). & Diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$), em relação ao grupo controle negativo (CN). Kruskal-Wallis seguido de teste de Bonferroni.



5.3 Peso de órgãos

O peso relativo dos órgãos de machos (Tabela 3) e fêmeas (Tabela 4), eutanasiados na puberdade, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos expostos via útero e lactação a diferentes concentrações da oleuropeína e o grupo controle.

Tabela 3 – Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos púberes expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM ($n=15, 12, 21$ e 14 , respectivamente).

Peso relativo %	GRUPOS			
	CN	G1	G2	G3
Coração	0,34±0,01	0,32±0,01	0,32±0,005	0,34±0,01
Baço	0,25±0,01	0,27±0,01	0,25±0,005	0,27±0,01
Fígado	5,63±0,09	5,33±0,16	5,46±0,14	5,53±0,12
Rim direito	0,44±0,01	0,43±0,01	0,41±0,02	0,43±0,01
Rim esquerdo	0,41±0,01	0,42±0,01	0,41±0,01	0,41±0,01
Testículo direito	0,50±0,01	0,52±0,01	0,50±0,01	0,51±0,01
Testículo esquerdo	0,51±0,01	0,53±0,01	0,49±0,01	0,51±0,01
Epidídimo direito	0,11±0,003	0,11±0,004	0,10±0,003	0,11±0,003
Epidídimo esquerdo	0,10±0,003	0,11±0,004	0,10±0,003	0,10±0,002
Próstata	0,09±0,005	0,08±0,004	0,08±0,004	0,10±0,01
Vesícula seminal	0,11±0,01	0,11±0,01	0,11±0,01	0,11±0,01

Tabela 4 – Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas púberes expostas via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM ($n=15, 13, 19$ e 14 , respectivamente).

Peso relativo %	GRUPOS			
	CN	G1	G2	G3
Coração	0,38±0,01	0,36±0,01	0,35±0,01	0,39±0,01
Baço	0,29±0,01	0,32±0,01	0,29±0,01	0,30±0,01
Fígado	5,11±0,15	5,06±0,11	4,70±0,12	4,99±0,12
Rim direito	0,45±0,01	0,45±0,01	0,45±0,01	0,44±0,01
Rim esquerdo	0,44±0,01	0,44±0,01	0,44±0,01	0,43±0,01
Ovário direito	0,03±0,002	0,03±0,002	0,03±0,002	0,03±0,001
Ovário esquerdo	0,03±0,002	0,04±0,002	0,03±0,001	0,03±0,001
Útero	0,20±0,01	0,21±0,02	0,18±0,01	0,19±0,01

5.4 Índices de fertilidade de machos púberes

Os índices de fertilidade de machos púberes expostos durante o período gestacional e lactacional a oleuropeína são apresentados na Tabela 5. O grupo exposto a maior dosagem do composto obteve uma maior porcentagem de espermatozoides anormais ($P < 0,05$) em comparação ao grupo controle negativo. Mesmo não havendo diferença estatística significativa, é possível observar uma diminuição dos parâmetros de produção diária de espermatozoides e no número de espermatozoides em todos os grupos de tratamento comparados ao grupo controle negativo.

Tabela 5 – Índices de fertilidade dos machos púberes expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média \pm EPM ou percentual.

	GRUPOS			
	CN (n=15)	G1 (n=12)	G2 (n=21)	G3 (n=14)
Produção diária espermatozoides ($\times 10^6$)	17,28 \pm 1,20	16,43 \pm 1,69	13,94 \pm 0,75	12,67 \pm 1,37
Número espermatozoides ($\times 10^6$)	155,93 \pm 15,23	139,67 \pm 8,69	137,48 \pm 10,99	134,21 \pm 11,48
Espermatozoides anormais (%)	2,17 \pm 0,33	4,79 \pm 0,44*	3,03 \pm 0,43	2,79 \pm 0,60

* Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), em relação ao grupo controle negativo (CN). ANOVA seguida de teste de Bonferroni.

5.5 Campo aberto

A Tabela 6, apresenta os parâmetros de comportamento em campo aberto de machos expostos via útero e lactação a diferentes concentrações de oleuropeína e água destilada. Os machos, provenientes de mães tratadas com 2000 mg/kg/dia de oleuropeína, durante a gestação e lactação, apresentaram um aumento no tempo de permanência no centro em comparação ao grupo CN ($P < 0,05$). Para as demais variáveis comportamentais observadas, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados e o controle.

Tabela 6 – Parâmetros de comportamento em campo aberto de machos expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média \pm EPM ($n=13, 11, 18$ e 14 , respectivamente).

	GRUPOS			
	CN	G1	G2	G3
Locomoção total	59,00 \pm 4,71	67,64 \pm 3,15	64,61 \pm 2,64	60,93 \pm 4,37
Permanência no centro (s)	15,38 \pm 1,68	27,09 \pm 3,63*	22,78 \pm 2,17	18,36 \pm 2,13
<i>Rearing</i>	22,00 \pm 1,71	24,36 \pm 1,46	24,67 \pm 1,51	22,29 \pm 2,10
Bolos fecais	2,77 \pm 0,51	2,73 \pm 0,43	2,28 \pm 0,51	3,07 \pm 0,38

* Diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$), em relação ao grupo controle negativo (CN). ANOVA seguida de teste de Bonferroni.

5.6 Comportamento sexual

A Tabela 7 mostra os resultados do comportamento sexual da progênie exposta via útero e lactação a oleuropeína em três concentrações (G1, G2 e G3) e um controle negativo (CN). Como é possível observar, não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros de comportamento sexual frente à primeira experiência sexual.

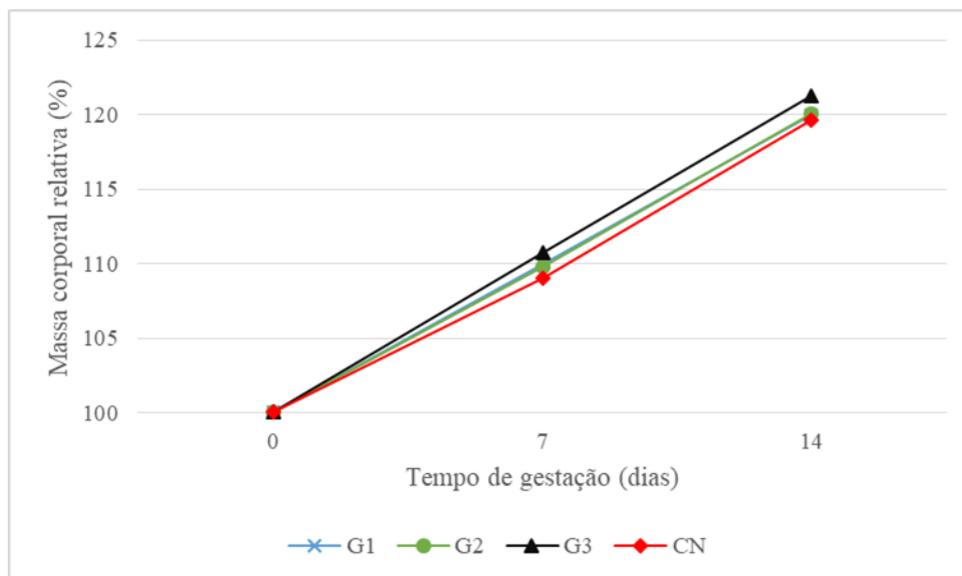
Tabela 7 – Parâmetros de comportamento sexual de machos e fêmeas adultos expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média \pm EPM ($n= 13, 13, 13$ e 15 , respectivamente).

Parâmetros	GRUPOS			
	CN	G1	G2	G3
Latência para 1ª monta (min)	1,12 \pm 0,17	1,12 \pm 0,22	0,80 \pm 0,10	1,08 \pm 0,16
Latência para 1ª intromissão (min)	1,30 \pm 0,16	1,18 \pm 0,21	1,38 \pm 0,25	1,35 \pm 0,19
Latência para 1ª ejaculação (min)	12,98 \pm 0,83	16,86 \pm 1,66	17,61 \pm 1,39	13,75 \pm 1,08
Nº de montas incompletas até a 1ª ejaculação	9,00 \pm 2,69	13,54 \pm 2,56	12,77 \pm 2,27	6,73 \pm 0,88
Total de montas incompletas e intromissões nos 30 min.	62,54 \pm 5,45	60,15 \pm 4,23	66,62 \pm 4,62	51,60 \pm 4,22
Latência para 1ª intromissão após a 1ª ejaculação (min)	3,49 \pm 0,29	3,69 \pm 0,10	3,43 \pm 0,21	3,88 \pm 0,19
Nº de ejaculações	1,75 \pm 0,20	2,00 \pm 0,23	1,77 \pm 0,20	2,14 \pm 0,20
Coefficiente de lordose (%)	0,90 \pm 0,04	0,83 \pm 0,03	0,83 \pm 0,05	0,95 \pm 0,09

5.7 Variáveis das fêmeas na fase adulta

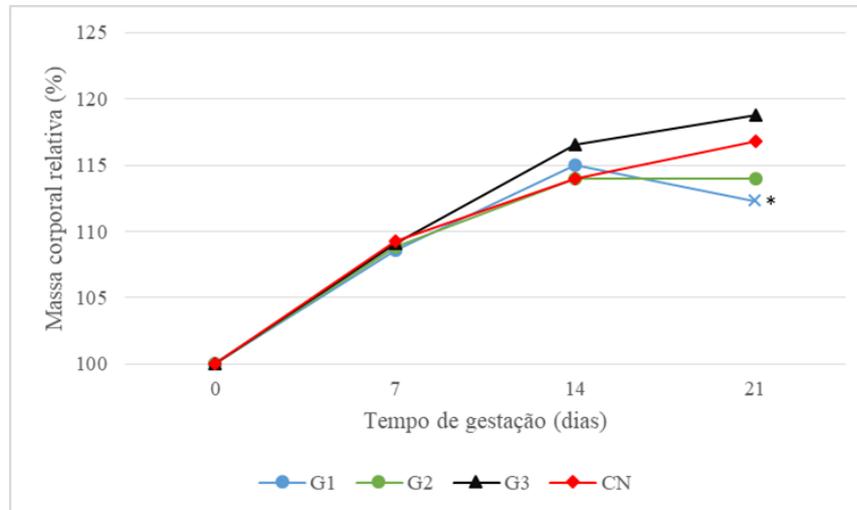
A Figura 7 apresenta o desenvolvimento ponderal relativo (massa corporal do 1º dia = 100%) durante o período de gestação das fêmeas adultas expostas via útero e lactação a oleuropeína em três concentrações (G1, G2 e G3) e um controle negativo (CN), que foram submetidas ao teste de comportamento sexual. As fêmeas obtiveram um desenvolvimento semelhante em todos os grupos, não ocorrendo diferenças estatísticas significativas.

Figura 7 – Massa corporal relativa durante a gestação das progenitoras (1º dia = 100%) expostas via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média \pm EPM ($n=10, 13, 11$ e 8 , respectivamente).



A Figura 8 mostra o desenvolvimento ponderal relativo (massa corporal do 1º dia = 100%) durante o período de lactação das fêmeas adultas expostas via útero e lactação a oleuropeína em três concentrações (G1, G2 e G3) e um controle negativo (CN), que foram submetidas ao teste de comportamento sexual. Houve diferença estatística significativa apenas no último dia de lactação, o grupo G1 teve uma redução no percentual de massa corporal em comparação ao grupo CN.

Figura 8 – Massa corporal relativa durante a lactação das progenitoras (1º dia = 100%) expostas via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM ($n=10, 13, 11$ e 8 , respectivamente). * Diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$), em relação ao grupo controle negativo. ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.



O peso relativo dos órgãos das fêmeas eutanasiadas na fase adulta é apresentado na Tabela 8. Houve diferença estatística significativa apenas para o peso relativo do rim direito no grupo exposto a maior dose de oleuropeína (G1) em comparação ao grupo controle negativo ($P=0,038$). Para os demais órgãos não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de tratamento e o grupo CN.

Tabela 8 – Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas adultas expostas via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em média ± EPM ($n= 8, 11, 13$ e 11 , respectivamente).

Peso relativo %	GRUPOS			
	CN	G1	G2	G3
Coração	0,35±0,01	0,35±0,01	0,36±0,01	0,36±0,004
Baço	0,22±0,01	0,24±0,02	0,24±0,01	0,23±0,01
Fígado	6,58±0,14	5,93±0,28	6,20±0,13	6,69±0,11
Rim direito	0,48±0,01	0,43±0,01*	0,46±0,01	0,45±0,01
Rim esquerdo	0,44±0,01	0,40±0,01	0,44±0,01	0,44±0,01
Ovário direito	0,02±0,001	0,02±0,002	0,02±0,0005	0,02±0,001
Ovário esquerdo	0,02±0,0003	0,02±0,001	0,02±0,001	0,02±0,001
Útero	0,16±0,023	0,13±0,01	0,13±0,01	0,15±0,01
Implantes	11,38±0,73	11,55±0,43	10,38±0,98	11,45±0,51

* Diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$), em relação ao grupo controle negativo (CN). ANOVA seguida de teste de Bonferroni.

Os índices reprodutivos das fêmeas adultas expostas via útero e lactação a oleuropeína em três concentrações (G1, G2 e G3) e um controle negativo (CN), que foram submetidas ao teste de comportamento sexual, são apresentados na Tabela 9. O grupo exposto a 1000 mg/kg/dia de oleuropeína manifestou diferença significativa para a taxa de gestação em comparação ao grupo CN. Apesar de não demonstrar diferença estatisticamente significativa, é possível observar que houve um aumento na porcentagem de perdas pós-implantação em todos os grupos expostos a oleuropeína, especialmente o grupo G2, que obteve uma porcentagem elevada comparada ao grupo CN, mas que não foi estatisticamente significativa ($P=0,055$). Para os demais parâmetros, não foram manifestadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 9 – Índices de fertilidade das fêmeas adultas expostas via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), e 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em percentual ou média \pm EPM.

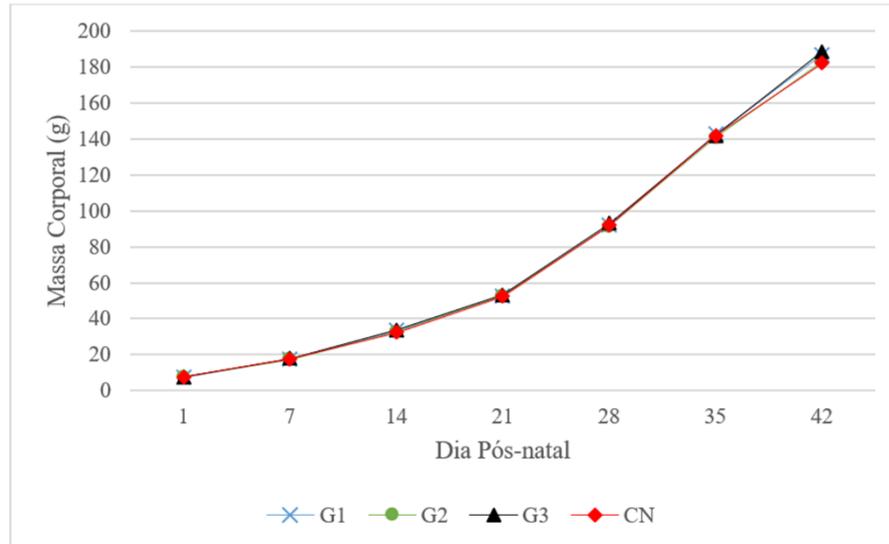
	GRUPOS			
	CN (n=13)	G1 (n=13)	G2 (n=13)	G3 (n=15)
Taxa de acasalamento (%)	86,67	86,67	100	86,67
Taxa de gestação (%)	61,54	76,92	100*	73,33
Taxa de parto (%)	100	100	100	100
Taxa de perda pós-implantação (%)	4,40	12,60	8,89	7,14
Taxa de natalidade (%)	98,85	92,79	100	99,15
Taxa de viabilidade (%)	100	98,06	100	100
Taxa de desmame (%)	100	98,06	99,19	100
Número de filhotes/ninhada	10,88 \pm 0,45	10,09 \pm 0,85	9,46 \pm 1,08	10,64 \pm 0,70

* Diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$), em relação ao grupo controle negativo (CN). Teste exato de Fisher ou ANOVA.

5.7.1 Variáveis das progênes

A Figura 9, apresenta a evolução da massa corporal da progênie de ratos e ratas expostos via útero e lactação a oleuropeína em três concentrações (G1, G2 e G3) e um controle negativo (CN). As ninhadas foram acompanhadas desde o dia 0 PND até o 42 PND. Verificou-se que não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos de tratamento e o grupo CN.

Figura 9 – Evolução da massa corporal (g) individual da progênie (geração F2) de machos e fêmeas (geração F1) expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3) durante os períodos de gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos ($n=64, 72, 80$ e 80 , respectivamente). ANOVA de medidas repetidas ($P>0,05$).



A Tabela 10 apresenta as características de desenvolvimento geral e sexual das progênies de ratos e ratas expostos via útero e lactação a três doses de oleuropeína e água destilada. Referente ao desenvolvimento físico, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos de tratamento e o grupo controle negativo. Com relação ao desenvolvimento sexual, apenas foi observada uma antecipação na abertura do canal vaginal das fêmeas do grupo G1 e G2 em comparação ao grupo CN ($P<0,05$).

Tabela 10 – Características de desenvolvimento geral e sexual estimado em dias (tempo), da progênie (geração F2) de machos e fêmeas (geração F1) expostos via útero e lactação a água destilada (CN), 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G1), 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2), 500 mg/kg/dia de oleuropeína (G3). Dados expressos em mediana e percentis. ($n = 64, 72, 80$ e 80 respectivamente para ninhadas e $26, 38, 37$ e 45 para machos respectivamente e $38, 34, 43$ e 35 para fêmeas respectivamente).

Características	GRUPOS			
	CN	G1	G2	G3
Descolamento de orelhas	3(2-3)	3	3(2-3)	3(2-3)
Aparecimento da penugem	5	5	5	5
Aparecimento de pelos	8	8	8	8
Erupção de incisivos	10(10-11)	10(10-11)	11(10-11)	10(10-11)
Abertura dos olhos	14(13-14)	14(13-14)	14	14(13-14)
Separação prepucial	39(39-40)	39(37,75-41)	40(39-41,50)	39(38-40)
Abertura do canal vaginal	37(35-40)	34(33-37,25)*	34(32-36)*	36(35-38)

* Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), em relação ao grupo controle negativo (CN). Kruskal-Wallis, seguido de teste de Bonferroni.

6 DISCUSSÃO

A utilização de plantas para fins medicinais, como tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática médica da humanidade (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Entre as plantas utilizadas como fitoterápico, a oliveira (*Olea europaea* L.) tem sido historicamente utilizada como remédio popular para combater uma gama de enfermidades (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015; ÖZCAN; MATTHÄUS, 2017). As indicações terapêuticas na medicina tradicional apontam para sua utilização na redução de glicemia, do colesterol e de ácido úrico. Sendo empregada no tratamento de diabetes, hipertensão, inflamação, diarreia, infecções do trato respiratório e urinário, doenças gástricas e intestinais, asma e reumatismo (HASHMI *et al.*, 2015). A oleuropeína é o biofenol mais abundante nas folhas da oliveira (SOLER-RIVAS; ESPÍN; WICHERS, 2000) e, é apontada como responsável pela maioria de suas propriedades biológicas e farmacológicas (CAVACA *et al.*, 2020). É conhecida por sua ação antioxidante, pela eficácia no tratamento de doenças crônicas cardiovasculares, diabetes, e atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus, leveduras, fungos e alguns parasitas (JUVEN; HENIS, 1970; FLEMING *et al.*, 1973; GOURAMA *et al.*, 1989; TRANTER; TASSOU; NYCHAS, 1993; TASSOU; NYCHAS, 1995; BISIGNANO *et al.*, 1999; McDONALD *et al.*, 2001; TUCK; HAYBALL, 2002; MARKIN *et al.*, 2003; KORUKLUOGLU *et al.*, 2004; MICOL *et al.*, 2005; MELLO; PINHEIRO, 2012). Nosso grupo vem desenvolvendo projetos de pesquisa que envolvem a análise química e a prospecção de substâncias com promissora atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de diferentes frações da *Olea europaea* L.

Ao se reconhecer os benefícios da utilização de fitoterápicos não devemos deixar de lado os cuidados com as possíveis reações adversas e a toxicidade das preparações (MELLO; MELLO; LANGELOH, 2009). O presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos da oleuropeína, a substância ativa majoritária na oliveira (*Olea europaea*), sobre o desenvolvimento da progênie de ratos Wistar, exposta a três doses diferentes do composto, durante as fases do desenvolvimento fetal e lactação.

6.1 Avaliação geral da prole (Geração F1)

A avaliação do peso dos animais é um parâmetro utilizado como indicador do estado de saúde e desenvolvimento, fornecendo informações importantes sobre a toxicidade

(HOLLENBACH *et al.*, 2015). Com relação a essa avaliação, não obtivemos resultados com diferença estatística significativa, indicando que o desenvolvimento ponderal da progênie de machos e fêmeas, tratados com diferentes concentrações de oleuropeína, não foi afetado pela exposição ao composto quando comparado ao grupo controle. A evolução da massa corporal observada é compatível com o esperado para a espécie (PASSOS *et al.*, 2000). Nossos dados corroboram com os resultados encontrados para fitoterápicos por Mello *et al.* (2008), que testou uma formulação fitoterápica contendo *Aloe ferox*, *Quassia amara*, *Cynara scolymus*, *Gentiana lutea*, *Peumus boldus*, *Rhamnus purshiana*, *Solanum paniculatum* e *Valeriana officinalis* quanto aos potenciais efeitos tóxicos. Os resultados mostraram que não houve diferença no desenvolvimento da prole de ratas tratadas, durante os períodos de gestação e lactação, em relação a prole do grupo controle. Hollenbach (2013) e Santos (2017) investigaram o potencial tóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L., respectivamente, e obtiveram resultados similares aos do presente estudo, onde a progênie de grupos expostos via útero e lactação ao óleo essencial se desenvolveram de forma semelhante ao grupo controle negativo.

Segundo Robinson e Brumley (2005) a observação de características de maturação da progênie, como desenvolvimento do pelo, erupção dos dentes incisivos e abertura dos olhos é essencial na avaliação do efeito de um agente tóxico sobre o desenvolvimento cerebral pós-natal. No presente estudo, o desenvolvimento das características físicas da prole foram alterados pela exposição a oleuropeína. O tratamento acarretou em atraso no descolamento de orelhas e abertura de olhos, porém, no grupo exposto a 500 mg/kg/dia (G3) de oleuropeína, houve uma erupção precoce de dentes incisivos. Indicando que a exposição durante os períodos de gestação e lactação a oleuropeína interfere no desenvolvimento de características físicas da progênie.

Em estudo realizado por Korenbrot *et al.* (1977) a separação prepucial demonstrou ser uma boa opção como índice de puberdade em ratos machos, pois a sua manifestação é dependente da presença contínua de baixos níveis de andrógeno. A separação prepucial também demonstrou preceder tanto o aparecimento de espermatozoides móveis na cabeça do epidídimo quanto o aumento dos níveis de andrógeno circulante, além do desenvolvimento do comportamento copulatório total, pois para ejacular o macho necessita poder expor completamente o pênis (KORENBROT; HUHTANIEMI; WEINER, 1977). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com 2000 mg/kg/dia de oleuropeína acarretou em um retardo na separação prepucial da progênie em comparação ao grupo controle negativo ($P < 0,001$), sugerindo que a exposição ao composto pode causar um atraso no desenvolvimento da

puberdade. Entretanto, mesmo demonstrando diferença significativa em relação ao grupo controle, todos os animais se desenvolveram conforme fisiologia da espécie (KORENBROT; HUHTANIEMI; WEINER, 1977; AGUILAR *et al.*, 1988).

Os reflexos e as respostas de um neonato permitem que ele reaja ao ambiente em que vive, esses reflexos são instintivos e servem para protegê-lo; todos os filhotes nascem com os mesmos reflexos, porém as respostas são totalmente individuais (CAMARGO, 2010). É sabido que a exposição maternal à xenobióticos durante o período gestacional pode causar neurotoxicidade no desenvolvimento e/ou anormalidades comportamentais nos descendentes (CASTRO; BERNARDI; PALERMO-NETO, 1992). De acordo com os mesmos autores, alterações no sistema nervoso causadas por exposição maternal são passíveis de ocorrer até mesmo na vida adulta, e as avaliações comportamentais são capazes de demonstrar tais modificações. A realização de testes de reflexo (teste de endireitamento em superfície, geotaxia negativa e força ao agarrar) são indicadores sensíveis dos primeiros estágios do desenvolvimento motor do neonato (CHIAVEGATTO; OLIVEIRA; BERNARDI, 1997; WHISHAW; KOLB, 2005).

Durante a ontogenia, o desenvolvimento do controle postural depende de diversos processos neurobiológicos e da percepção do mundo externo (CAMARGO, 2010). Segundo Altman e Sudarsham (1975), os sistemas vestibular, exteroceptivo e proprioceptivo podem estar envolvidos com a regulação da postura. Os neonatos demonstram reflexo postural, tornando-se mais importante com a idade, iniciando no dia 1 e com o passar dos dias o animal desenvolve estratégias posturais, acarretando em uma aceleração na realização da tarefa (WHISHAW; KOLB, 2005). Os presentes dados indicam que o reflexo de endireitamento em superfície não foi alterado de forma significativa pela exposição a oleuropeína. É possível, ainda, observar que há uma linearidade do reflexo com o dia em que o teste foi realizado, com uma tendência a melhorar o desempenho com o passar dos dias, dessa forma, apresentando um reflexo mais desenvolvido ou bem formado.

A geotaxia refere-se a resposta de orientação e a movimentos expressos em oposição às pistas dos vetores gravitacionais (FRAENKEL; GUNN, 1961 *apud* MOTZ; ALBERTS, 2005); diagnosticando problemas na função vestibular e/ou proprioceptiva, ou ainda na função exteroceptiva do animal (CHIAVEGATTO; OLIVEIRA; BERNARDI, 1997). Em nosso estudo é possível notar que a oleuropeína em doses altas causou um atraso na reorientação dos filhotes nos primeiros dois dias da avaliação, o que leva a supor que a exposição a oleuropeína pode interferir na relação do animal com o mundo a sua volta. Tendo em vista que, aparentemente,

um animal que não demonstra boa percepção espacial pode ser mais facilmente predado ou apresentar dificuldades na procura por alimento e fêmeas para reprodução (CAMARGO, 2010). Entretanto, essa diferença significativa não se conservou no PND 9 e 10, demonstrando que as alterações causadas foram reversíveis.

O rato desenvolve a habilidade de “agarrar”, entre o dia 14 e o dia 17 pós-natal. O teste geralmente é utilizado a fim de complementar os testes de função motora, através da avaliação da resposta de força muscular e articulação das patas (MAURISSEN *et al.*, 2003), onde o animal deve ser capaz de sustentar o peso de seu próprio corpo por um tempo determinado (BROLESE, 2009). Nossos resultados demonstraram que os animais expostos via útero e lactação as maiores dosagens da oleuropeína (G1 e G2) permaneceram menos tempo agarrados no PND 14 quando comparados ao grupo exposto a água destilada (Figura 5). Sugerindo que, em altas concentrações, a oleuropeína pode interferir no desenvolvimento da força muscular ou ter uma ação direta no sistema nervoso central da progênie na fase inicial de desenvolvimento. Porém, essa diferença significativa não se conservou nos demais dias de realização do teste, demonstrando que as alterações causadas foram reversíveis.

6.2 Peso de órgãos

Arantes-Rodrigues e colaboradores (2011), investigaram os efeitos de três concentrações diferentes do extrato de folha de oliveira sobre a funcionalidade do fígado de camundongos ao longo de 14 semanas. Foi observado um aumento no peso relativo do fígado nos grupos tratados com as maiores concentrações, este aumento foi relacionado a alterações histológicas como hiperplasia das vias biliares, fibrose e infiltrado inflamatório (ARANTES-RODRIGUES *et al.*, 2011). Nossos resultados demonstram que a exposição via útero e lactação a oleuropeína não alterou o ganho de massa relativa dos órgãos de machos e fêmeas na puberdade, sugerindo que não houve interferência pelo tratamento.

6.3 Índices reprodutivos de machos púberes

A morfologia espermática é um dos parâmetros menos variável em indivíduos normais, podendo ser utilizada na detecção de eventos de toxicidade espermática (ZENICK *et al.*, 1994). A presença de espermatozoides com anormalidades morfológicas pode indicar um processo de espermatogênese desintegrado e incompleto (ASHKANANI *et al.*, 2020). Estudos sugerem que quanto maior for o número de espermatozoides anormais na ejaculação, maior a probabilidade

de redução da fecundidade (NESTOR; HANDEL, 1984; REDI *et al.*, 1984). Em ensaio conduzido por Rostamzadeh *et al.* (2020), o tratamento com 100 mg/kg de oleuropeína atenuou os efeitos nocivos da ciclofosfamida (CP) no sistema reprodutor masculino; através da diminuição dos efeitos da ciclofosfamida na espermatogênese em camundongos. Anormalidades espermáticas foram significativamente reduzidas nos animais que receberam a oleuropeína, em comparação ao grupo exposto a CP (ROSTAMZADEH *et al.*, 2020). Nessa mesma linha, Ashkanani *et al.* (2020) avaliou o efeito protetor do extrato de folhas de oliveira (OLE) contra danos reprodutivos induzidos pelo fungicida Mancozeb em camundongos machos. Os resultados obtidos pela administração via oral de 200 mg/kg de OLE demonstraram uma efetiva proteção contra os efeitos deletérios induzidos pelo Mancozeb. Entretanto, a dose de 400 mg/kg não melhorou significativamente os parâmetros funcionais dos espermatozoides, sugerindo que em doses altas a OLE pode exacerbar os efeitos prejudiciais sobre o sistema reprodutor masculino (ASHKANANI *et al.*, 2020). Corroborando com os nossos resultados, que demonstraram uma maior porcentagem de espermatozoides anormais no grupo exposto a 2000 mg/kg/dia de oleuropeína em comparação ao grupo controle negativo ($P < 0,05$).

6.4 Campo aberto

O teste de campo aberto tem sido amplamente utilizado, tanto para quantificar movimentos locomotores e de exploração dos animais de laboratório (HOLLENBACH, 2013) quanto para analisar comportamentos semelhantes à ansiedade. O teste foi desenvolvido para avaliar o estado emocional de animais, submetendo-os a um ambiente desconhecido, cuja fuga é impedida pelas paredes do aparato (GOGAS *et al.*, 2007). A maioria dos ratos tende a passar a grande parte do tempo próximo às paredes, um fenômeno denominado timotaxia (GOULD, 2009). Os machos expostos a maior concentração de oleuropeína apresentaram um aumento no tempo de permanência no centro em comparação ao grupo controle, o que pode indicar uma diminuição do nível de ansiedade destes animais. Reafirmando o que foi demonstrado em estudo coordenado por Lee *et al.* (2018), que investigou os efeitos da oleuropeína em sintomas de ansiedade em ratos após exposição prolongada ao estresse, inibindo o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Ratos machos Sprague Dawley receberam três doses diferentes de oleuropeína (10, 50 e 70 mg/kg, via intraperitoneal, uma vez ao dia) durante 14 dias após a exposição ao estresse. Os animais tratados com a maior dose de oleuropeína cruzaram mais vezes a zona central no teste de campo aberto. Também foi observado que a oleuropeína

bloqueou a diminuição, induzida pelo estresse, de serotonina e expressão do neuropeptídeo Y no hipocampo, sugerindo um potencial efeito ansiolítico (LEE *et al.*, 2018).

Nossos resultados também estão de acordo com Sarfaraz *et al.* (2019), que investigou o potencial ansiolítico do chá de folhas de oliveira em camundongos. Os animais foram divididos em dois grupos, o grupo I recebeu 0,2 ml, via oral, de água destilada e foi utilizado como controle, os animais do grupo II receberam 0,2 ml, via oral, de chá de folha de oliveira. Os animais do grupo tratado cruzaram mais vezes os quadrantes centrais em comparação ao grupo controle, e os autores sugerem que o composto fenólico oleuropeína seja o responsável pela atividade ansiolítica (SARFARAZ *et al.*, 2019).

De acordo com Bernardi e Palermo-Neto (1984), a defecação é reativa ou emocional, sendo uma resposta autonômica que ocorre em situações de novidade ou aversivas, podendo ser considerada, com alguma reserva, uma medida de emocionalidade no teste de campo aberto. Frente a esse parâmetro, nossos dados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas, indicando ausência de alterações na emocionalidade da prole. Habilidades motoras constituem uma das mais importantes manifestações na relação de um ser vivo com seu ambiente (CAMARGO, 2010). Os comportamentos locomotores estão estreitamente relacionados à sobrevivência dos mamíferos e requerem uma coordenação fina e precisa na atividade simultânea das diversas vias motoras (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1984). No campo aberto o número de setores cruzados é a medida mais utilizada na avaliação da atividade locomotora (HOLLENBACH, 2013) e os animais testados mostraram-se livres na execução da tarefa.

6.5 Comportamento sexual

O comportamento sexual é frequentemente considerado como parte de um conjunto de padrões comportamentais que tem como propósito ou finalidade a manutenção das espécies; o adequado desempenho sexual é fundamental para a reprodução animal, isto posto, disfunções no comportamento sexual podem afetar negativamente o potencial reprodutivo de animais domésticos (ÁGMO, 1997). Um ciclo de cópula pode ser dividido em três partes, a fase pré-copulatória, a fase copulatória e a fase executiva (SNOEREN *et al.*, 2014). Durante a fase pré-copulatória, o macho e a fêmea cheiram a região anogenital um do outro; a fase copulatória consiste na fêmea chamando a atenção do macho, e em reação a esse comportamento, o macho tenta montar a fêmea e ocorre uma série de montas incompletas e intromissões que estimulam um fenômeno receptivo na fêmea conhecido como lordose (HEIJKOOP; HUIJIGENS;

SNOEREN, 2018). Esses comportamentos tendem a ocorrer em rápida sucessão, apenas sendo interrompidos por autolimpeza, descanso e ritmo das fêmeas (comportamento de fuga). Por fim, a ejaculação constitui a fase executiva, seguida de um período de inatividade masculina, geralmente com duração de cerca de 5 minutos (HEIJKOOP; HUIJIGENS; SNOEREN, 2018).

Ao analisarmos o comportamento sexual de machos, são observados a motivação e o desempenho sexual, mas apesar da distinção, ambos se relacionam intimamente (MEISEL; SACHS, 1994 *apud* RODRIGUES-ALVES, 2007). A procura por contato sexual com outro animal é parte de um processo que comumente refere-se como motivação sexual ou libido; e o desempenho sexual ou potência é a eficiência de ereção e orientações penianas (RODRIGUES-ALVES, 2007). O comportamento sexual proporciona o vínculo entre a fisiologia interna de um animal e o ambiente externo; comportamentos específicos, definíveis e previsíveis são produzidos por variações específicas na função fisiológica (WEBER, 1997). Mudanças na natureza ambiental ou de respostas biológicas internas tem o potencial de induzir alterações comportamentais, alterações estas que podem modificar sutilmente a capacidade de sobrevivência de uma determinada população (WEBER, 1997).

Em estudo conduzido por Santos (2017), onde foram avaliadas progênes expostas via útero e lactação ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., observou-se que houve interferência do tratamento no desenvolvimento de características do comportamento sexual. A exposição a 300 mg/kg^{-1} do óleo essencial conduziu, nos filhotes, ao aumento no número de montas incompletas, montas incompletas e intromissões até a primeira ejaculação e maior número de montas incompletas e intromissões nos 30 minutos de teste.

Nossos dados demonstraram que a exposição a oleuropeína não interferiu nos parâmetros de comportamento sexual frente à primeira experiência sexual. Esses dados corroboram com os encontrados por Dantas (2016), onde foram investigados os efeitos da exposição durante os períodos de gestação e amamentação ao óleo essencial de *Origanum majorana* sobre parâmetros reprodutivos. Com relação aos parâmetros de comportamento sexual, os resultados obtidos não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos expostos ao óleo e o grupo controle negativo (DANTAS, 2016).

6.6 Variáveis das fêmeas na fase adulta

6.6.1 Evolução da massa corporal nos períodos de gestação e lactação

As fêmeas utilizadas no teste de comportamento sexual foram avaliadas quanto ao seu desempenho reprodutivo. Foi analisada a variação de peso das fêmeas durante o período gestacional e lactacional, peso relativo dos órgãos e índices reprodutivos.

Sabe-se que o peso corporal flutua normalmente com o estado fisiológico do animal, pois os hormônios estrogênio e progesterona influenciam na ingestão de alimentos e no consumo energético, as taxas de retenção de água e deposição de gordura também são afetadas (ROMAN, 2014). A exposição via útero e lactação a oleuropeína não alterou o desenvolvimento ponderal relativo durante o período de gestação das fêmeas adultas proveniente do teste de comportamento sexual. Durante a lactação, houve uma diminuição significativa na massa corporal relativa das fêmeas expostas a 2000 mg/kg/dia (G1) do composto fenólico. Contudo, a diminuição no peso das progenitoras do grupo G1 não demonstrou afetar negativamente o desenvolvimento das progênes, como será apresentado a seguir. Isso pode estar relacionado ao fato da diminuição na massa corporal ter ocorrido apenas no último dia de lactação, pois sabe-se que aos 16 dias de vida os filhotes já começam a se alimentar independentemente e dos 18 aos 24 já estão aptos ao desmame (SANTOS, 2002).

6.6.2 Peso de órgãos

Alterações na massa relativa de órgãos reprodutivos provêm claras evidências para classificar um agente como potencialmente prejudicial ao sistema reprodutor (ROMAN et al., 2014). Em nosso estudo, não foram encontradas diferenças significativas no ganho de massa relativa de órgãos reprodutivos de fêmeas adultas expostas via útero e lactação a oleuropeína em diferentes doses, sugerindo que a exposição ao componente fenólico não interfere no desenvolvimento do sistema reprodutor de fêmeas. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa para o peso relativo do rim direito no grupo exposto a maior dose de oleuropeína em comparação ao grupo controle negativo ($P=0,038$). Para os demais órgãos não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de tratamento e o grupo CN.

6.6.3 Parâmetros reprodutivos

O grupo exposto a 1000 mg/kg/dia de oleuropeína (G2) manifestou diferença significativa para a taxa de gestação em comparação ao grupo CN. Pode-se observar anteriormente que o mesmo grupo mostrou no teste de comportamento sexual uma maior frequência de montas incompletas até a 1ª ejaculação em comparação ao grupo controle, que apesar de não ser significativa, poderia explicar os resultados obtidos na taxa de gestação. Pois, um aumento no número de montas e intromissões antes da ejaculação pode aumentar o número de espermatozoides no ejaculado e facilitar o transporte na fêmea, interferindo positivamente na fertilidade (HULL; WOOD; MCKENNA, 2006). Para os demais indicadores reprodutivos, como as taxas de acasalamento, parto, natalidade, perdas pós-implantação, viabilidade e desmame, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Os índices de fertilidade não foram prejudicados pela exposição prévia, apesar da porcentagem de espermatozoides anormais de machos púberes do grupo G1 ter sido significativamente afetada e da reduzida produção diária de espermatozoides e número de espermatozoides nos grupos de tratamento. Indicando que apesar da oleuropeína causar alterações nos índices de fertilidade de machos púberes, essas alterações não causaram efeitos negativos na reprodução durante a fase adulta. Isto se deve a uma característica da espécie em questão, onde reduções de até 60% na concentração espermática não são capazes de comprometer a fertilidade de ratos (AMANN, 1982).

6.6.4 Avaliação geral da prole (Geração F2)

A progênie proveniente de machos e fêmeas expostos via útero e lactação ao composto fenólico oleuropeína tiveram o seu desenvolvimento avaliado do dia 0 PND até o 42 PND. Em relação a evolução da massa corporal e desenvolvimento de características físicas, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos de tratamento e o grupo controle. Indicando que a exposição via útero e lactação da geração parental não afetou o desenvolvimento geral da progênie.

A puberdade em ratas fêmeas ocorre geralmente entre 30 e 50 dias de idade, e seu início pode ser observado através da abertura do canal vaginal (KENNEDY; MITRA, 1963; VANDENBERGH, 1976). Verificou-se uma antecipação na abertura do canal vaginal das fêmeas do grupo G1 e G2 em comparação ao grupo CN, esse resultado está de acordo com o encontrado por Jardim (2017), que avaliou o potencial toxicológico do alcaloide Boldina, o composto majoritário do *Peumus boldus*, sobre variáveis reprodutivas. No grupo exposto a

maior dosagem do alcaloide (100 mg/kg^{-1}), foi observada uma abertura precoce do canal vaginal quando comparado ao grupo controle. Contudo, mesmo demonstrando diferença estatística significativa, todos os animais se desenvolveram conforme fisiologia da espécie (KENNEDY; MITRA, 1963; VANDENBERGH, 1976).

7 Conclusão

A exposição à oleuropeína nas doses de 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg por dia, durante os períodos de gestação e lactação em ratos e ratas Wistar, para a avaliação da toxicidade peri e pós-natal, nos permite concluir que:

- A exposição a três doses diferentes da oleuropeína acarretou em alterações no desenvolvimento físico e sexual da prole, evidenciadas através da observação de atraso no descolamento de orelhas, abertura de olhos e separação prepucial, e ainda erupção precoce de dentes incisivos.
- A exposição a oleuropeína provocou alterações cognitivas e comportamentais (testes de reflexos e campo aberto), e interferência em índices reprodutivos pelo aumento no número de espermatozoides anormais encontrados em machos púberes.

As três doses utilizadas interferiram no desenvolvimento da progênie, o que limita sua recomendação durante os períodos gestacional e lactacional. Contribuindo com a elucidação de algumas questões referentes a segurança do seu uso como agente terapêutico.

Os resultados obtidos nos estudos do Segmento III, alvo desse estudo, devem ser analisados em conjunto com os observados pelo grupo de pesquisa nos Segmentos I e II, permitindo uma conclusão global sobre os efeitos da oleuropeína sobre a possível toxicidade reprodutiva decorrente da substância.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural source. **ARKIVOC**, n. 7, p. 116-145, 2007.
- ABEL, E. L.; DINTCHEFF, B. A. Effects of prenatal alcohol exposure on growth and development in rats. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 207, p. 916-921, 1978.
- ABRAMSON, J.H. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiologic Perspectives & Innovations*, 2011, 8:1/ WINPEPI11.65
- ACHAT, S.; TOMAO, V.; MADANI, K.; CHIBANE, M.; ELMAATAOUI, M.; DANGLES, O.; CHEMAT, F. Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 777-786, 2012.
- ÂGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain research protocols**, v. 1, n. 2, p. 203–209, maio 1997.
- AGUILAR, R.; BELLIDO, C.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E.; AGUILAR, E. Mechanisms of precocious puberty induced in male rats by pituitary grafts. **Journal of Reproduction & Fertility**. V. 83, p. 879-883, 1988.
- AL-AZZAWIE, H., ALHMAMDANI, M. Hypoglycemic and antioxisant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**. v. 78, p. 1371-1377, 2006.
- ALIREZAEI, M.; DEZFOULIAN, O.; NEAMATI, S.; RASHIDIPOUR, M.; TANIDE, N.; KHERADMAND, A. Oleuropein prevents ethanol-induced gastric ulcers via elevation of antioxidant enzyme activities in rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 68, p. 583-592, 2012.
- ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Animal Behavior**, v. 23, p. 896-920, 1975.
- AMANN, R. P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 2, p. 13-25, 1982.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia Para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos**. RESOLUÇÃO - RE Nº 90, DE 16 DE MARÇO DE 2004.
- ARANTES-RODRIGUES, R.; HENRIQUES, A.; PIRES, M. J.; COLAÇO, B.; CALADO, A. M.; REMA, P.; COLAÇO, A.; FERNANDES, T.; DE LA CRUZ, P. L. F.; LOPES, C.; FIDALGO-GONÇALVES, L.; VILELA, S.; PEDROSA, T.; PEIXOTO, F. High doses olive leaf extract induce liver changes in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1989-1997, 2011.
- ASANO, Y. Characteristics of open field behavior of Wistar and Sprague-Dawley rats. **Experimental Animals**. v.35, n.4, p. 505-508, 1986.
- ASHKANANI, M.; FARHADI, B.; GHANBARZADEH, E.; AKBARI, H. Study on the protective effect of hydroalcoholic Olive Leaf extract (oleuropein) on the testis and sperm parameters in adult male NMRI mice exposed to Mancozeb. **Gene Reports**, v. 21, p. 1-7, 2020.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Effects of apomorphine administration on rearing activity of control and experimental rats with drawn from long-term haloperidol treatment. **General Pharmacology**, v. 14, p. 545-547, 1983.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. *In*: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006, p. 807-816.

COSTA, P.A.; POLI, J.H.Z.; SPEROTTO, N.D.M.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; NIN, M.S.; BARROS, H.M.T. Brain DNA damage and behavioral changes after repeated intermittent acute ethanol withdrawal by young rats. **Psychopharmacology**, v. 232, p.3623-3636, 2015.

COSTA, P. A.; MAROSTEGA, F.; FREESE, L.; SCHÜLER NIN, M.; BARROS, H. BEHAVSOFT - Software for Scoring Animal Behavior, (Patente: 294091919042-3) 2019.

BISIGNANO, G.; TOMAINO, A.; CASCIO, R. L.; CRISAFI, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 971-974, mar. 1999.

BOCK, M., DERRAIK, J., BRENNAN, C. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebocontrolled, crossover trial. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, article ID e57622, 2013.

BOUAZIZ, M.; FKI, I.; JEMAI, H.; AYADI, M.; SAYADI, M. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. **Food Chemistry**, v. 108, p. 253-262, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Portaria 48**, de 16 de março de 2004. Diário Oficial da União, 18.03.2004.

BRASIL. **Lei n. 11.794**, de 8 de outubro de 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm (Acesso em: 31 jan. 2021).

BRASIL. **Decreto n. 6.899**, de 15 de julho de 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm. (Acesso em: 31 jan. 2021).

BROLESE, G. Marcadores de desenvolvimento em filhotes de ratas expostas ao álcool no período pré-natal. 2009. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BULOTTA, S.; CORRADINO, R.; CELANO, M.; D'AGOSTINO, M.; MAIUOLO, J.; OLIVEIRO, M.; PROCOPIO, A.; IANNONE, M.; ROTIROTI, D.; RUSSO, D. Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1609-1614, 2011.

CAMARGO, E. L. R. A. Estudo de neuroteratologia em ratos: efeitos da restrição alimentar e da monocrotalina. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CASTILLO, J. J.; ALCARAZ, M.; BENAVENTE-GARCÍA, O. Chapter 102 - Antioxidant and Radioprotective Effects of Olive Leaf Extract. *In*: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R. (eds). **Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention**, Academic Press, p. 951-958, 2010.

CASTRO, V.L.; BERNARDI, M.M.; PALERO-NETO, J. Evaluation of prenatal aldrin intoxication in rats. **Archives of Toxicology**. v.66, p.149-152, 1992.

CASTRO, V.L.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**. v.111, n.1-2, p.93-102, 2000.

CASTRO, V.L. **Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-Filhote Expostos a Agroquímicos**. Circular técnica 13, Embrapa Meio ambiente, Jaguariúna, SP. 2006.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, 71 Suppl 1: S58-65, 2000.

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária. Sistema CFMV/CRMVs. **Guia brasileiro de boas práticas em eutanásia em animais** – conceitos e procedimentos recomendados. v.1. Brasília: CFMV, 2012.

CHAHOU, I; FAQI, A.S. An optimized approach for the assessment of sexual behavior in male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 12(6), p. 667–671, 1998.

CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 217-226, 2004.

CHIAVEGATTO, S.; OLIVEIRA, C. A.; BERNARDI, M. M. Prenatal exposure of rats to diphenhydramine: effects on physical development, open field, and gonadal hormone levels in adults. **Neurotoxicology and teratology**, v. 19, p. 511-516, 1997.

CHIAVEGATTO, S.; BERNARDI, M.M.; DE-SOUZA-SPINOSA, H. Effects of prenatal diphenhydramine administration on sexual behavior of rats. **Braz J Med Biol Res**. v. 22, p.729-732, 1989.

CHRISTIAN, M.; SHAPER, V.; HOBERMAHN, A.; SENG, J.; Fu, L.; COVELL, D.; DIENER, R.; BITLER, R.; CREA, R. The toxicity of hydrolyzes aqueous olive pulp extract. **Drug and Chemical Toxicology**. v. 27, n. 4, p. 309-330, 2004.

CICERALE, S.; LUCAS, L. J.; KEAST, R. S. J. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. **Biotechnology**, v. 23, p. 129-135, 2012.

CLEFF, M.B. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida spp.*** 2008. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS.

CLEFF, M. B.; MADRIR, I.; MEINERZ, A. R.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B.; RODRIGUES, M. R.; ESCAREÑO, J. J. H.. Essential oils against *Candida spp.* in vitro antifungal activity of *Origanum vulgare*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 2245-2250, 2013.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretriz brasileira para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos** – DBCA. Brasília: CONCEA, 2016.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução Normativa nº 37 de 15 de fevereiro de 2018**. Brasília: CONCEA, 2018.

DALLEGRAVE, E. Toxicidade reprodutiva do herbicida Glifosato-Roundup® em ratos Wistar. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DAMTOFT, S.; FRANZYK, H.; JENSEN, S. R. Excelsioside, a secoiridoid glucosid from *Frazinus excelsior*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 4197-4201, 1992.

DAMTOFT, S.; FRANZYK, H.; JENSEN, S. R. Biosynthesis of secoiridoid glucosides in oleaceae. **Phytochemistry**, v. 34, p. 1291-1299, 1993.

DANTAS, A. S. Estudo de toxicidade reprodutiva e genotoxicidade do óleo essencial de *Origanum majorana*. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

EBISUI, L.; FONTES, R.S.; LAPCHIK, V.B.V. Rato. In: **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. (orgs). São Paulo: Ed. Atheneu. p. 229 – 250, 2009.

EMA – European Medicines Agency. Science Medicines Health. Committee on Health Medicinal Products. **Assessment report *Olea europaea L. folium***. p. 1-32, 2015.

ERBAY, Z.; ICIER, F. The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. **Food Reviews International**, v. 26, p. 319-334, 2010.

FANTONI, D.T; CORTOPASSI, S.R.G.; BERNARDI, M.M. Anestésicos Intravenosos e Outros Parenterais. In: SPINOSA, H.S. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

FAQI, A.S.; DALSENER, P.R.; MERKER, H-J. et al. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of TCDD in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.150, p. 383–92, 1998.

FDA - Food and Drug Administration. **Guideline for Industry**. Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products. 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/ucm074950.pdf> (Acesso em: 31 jan. 2021).

FELICIO, L.F; PALERMO-NETO,J.; NASELLO, A.G. Perinatal bromopride treatment: effects on sexual behavior of male and female rats. **Behav Natural Biol**. v. 52, p.145-151, 1989.

FERRAZZANO, G. F.; AMATO, I.; INGENITO, A.; ZARRELLI, A.; PINTO, G.; POLLIO, A. Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review. **Molecules**, v. 16, p. 1486-1507, 2011.

FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; MORELLI, P.L. Volatiles from leaves, fruits and virgin oil from *Olea europaea* cc. Olivastra Seggianese from Italy. **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 1382-1386, 2003.

FLEMING H. P.; WALTER W. H. J.; ETCHELLS J. L. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. **Appl. Microbiol.**, v. 26, p. 777-782, 1973.

GHANBARI, R.; ANWAR, F.; ALKHARFY, K. M.; GILANI, A. H.; SAARI, N. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3291-3340, 2012.

GINER, E.; RECIO, M.C.; RÍOS, J. L.; CERDÁ-NICOLÁS, J. M.; GINER, R. M. Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in c57bl/6 mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, p. 242-255, 2015.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; MIKÄIL, C.; ABOU, L.; PORTUGAL, H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 990-995, 2004.

GOGAS, K.R., LECHNER, S.M., MARKISON, S., WILLIAMS, J.P., MCCARTHY, W., GRIGORIADIS, D.E.; FOSTER, A.C. Anxiety - TAYLOR, J. B. *In*: TRIGGLE, D.J. (Ed.), **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. Oxford: Elsevier, 2007. cap. 6.04, p. 85–115.

GÓRNIAK, S. L.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Toxicologia do desenvolvimento. *In*: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri: Manole, 2008, p. 701-731.

GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The Open Field Test. *In*: GOULD, T. ed. **Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice**. Totowa: Humana Press, 2009. v. 42, cap. 1, p. 1-20.

GOURAMA H.; LETUTOUR B.; TANTAOUI ELARAKI, A.; BENBYA M.; BULLERMAN L.B. Effects of oleuropein, tyrosol and caffeic acid on the growth of mold isolated from olives. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 264-266, 1989.

HAN, J.; TALORETE, T. P. N.; YAMADA, P.; ISODA, H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. **Cytotechnology**, v. 59, p. 45-53, 2009.

HASHMI, M.; KHAN, A.; HANIF, F.; FAROOQ, U.; PERVEEN, S. Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europaea* (Olive). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Hindawi Publishing Corporation. p. 1-29, 2015.

HASSEN, I.; CASABIANCA, H.; HOSNI, K. Biological activities of the natural antioxidante oleuropein: Exceeding the expectation – A mini-review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 926-940, 2015.

- HEIJKOOP, R.; HUIJGENS, P. T.; SNOEREN, E. M. S. Assessment of sexual behavior in rats: The potentials and pitfalls. **Behavioural Brain Research**, v. 352, p. 70-80, 2018.
- HOLLENBACH, C. B. Estudo da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em ratos Wistar. 2013. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- HOLLENBACH, C. B.; BING, R. S.; STEDILE, R.; MELLO, F. P. S.; SCHUCH, T. L.; RODRIGUES, M. R. A.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. Reproductive Toxicity Assessment of *Origanum vulgare* Essential Oil on Male Wistar Rats. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 43, p. 1-7, jun. 2015.
- HULL, E. M.; WOOD, R. I.; MCKENNA, K. E. Neurobiology of male sexual behavior. *In*: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (eds.) **Physiology of Reproduction**, 3ed. Elsevier, Nova York, p. 1759-1760, 2006.
- HUR, W.; KIM, S. W.; LEE, Y. K.; CHOI, J. E.; HONG, S. W.; SONG, M. J.; BAE, S. H.; PARK, T.; UM, S. J.; YOON, S. K. Oleuropein reduces free fatty acid-induced lipogenesis via lowered extracellular signal-regulated kinase activation in hepatocytes. **Nutrition Research**, v. 32, p. 778-786, 2012.
- HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; RASHEED, S.; NIGAM, P. S.; JANNEH, O.; SARKER, S. D. Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 943-952, 2011.
- IBM SPSS Statistics 20. IBM. 2020. Software.
- IMPELLIZZERI, D.; ESPOSITO, E.; MAZZON, E.; PATERNITI, I.; DI PAOLA, R.; BRAMANTI, P.; MORITTU, M.; PROCOPIO, A.; BRITTI, D. The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy. **Clinical Nutrition**, v. 30, p. 533-540, 2011.
- IMPELLIZZERI, D.; ESPOSITO, E.; MAZZON, E.; PATERNITI, I.; DI PAOLA, R.; BRAMANTIM P.; MORITTU, M.; PROCOPIO, A.; PERRI, E.; BRITTI, D.; CUZZOCREA, S. The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 1413-1426, 2012.
- ITIS. Database, Integrated Taxonomic Information System On-line Database, Retrieved from the Integrated Taxonomic Information System on-line database, <http://www.itis.gov> (Acesso em: 2 fev. 2021)
- JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE-RODRÍGUES, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, p. 76-82, 2006.
- JARDIM, L. H. Avaliação da administração do alcaloide boldine em ratas Wistar durante o período gestacional sobre variáveis reprodutivas e comportamentais. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- JEMAIS, H.; EL FEKI, A.; SAYADI, S. Antidiabetic and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, v. 57, p. 8798-8804, 2009.
- JUVEN, B.; HENIS, Y. Studies on antimicrobial activity of olive phenolic compounds. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 33, p. 721-732, 1970.

- KAILIS, S. G. Olives. In: THOMAS, B.; MURRAY, B. G.; MURPHY, D. J. (eds), Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition). Academic Press, Cambridge, p. 236-245, 2017.
- KENDAL, M.; BATTERHAM, M.; OBIED, H.; PRENZLER, P. D.; RYAN, D.; ROBARDS, K. Zero effect of multiple dosage of olive leaf supplements on urinary biomarkers of oxidative stress in healthy humans. **Nutrition**, v. 25, p. 270-280, 2009.
- KENNEDY, G. C.; MITRA, J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. **Journal of Physiology**, v. 166, 0. 408-418, maio 1963.
- KORENBROT, C. C.; HUHTANIEMI, I.T.; WEINER, R. I. Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. **Biology of Reproduction**, v. 17, p. 298-303, 1977.
- KORUKLUOGLU M.; SAHAN Y.; YIGIT A.; TUMAY OZER E.; GUCER S. In vitro antibacterial activity of olive leaf (*Olea europaea* L.) extracts and their chemical characterization. KusadasI-Aydin, **4th Aegean Analytical Chemistry Days**, Turkey. 2004.
- KYRIAZIS, J. D.; ALIGIANNIS, N.; POLYCHRONOPOULOS, P.; SKALTSOUNIS, A. L.; DOTSIKA, E. Leishmanicidal activity assessment of olive tree extracts. **Phytomedicine**, v. 20, p. 275-281, 2013.
- LEE, B.; SHIM, I.; LEE, H.; HAHM, D.H. Oleuropein reduces anxiety-like responses by activating of serotonergic and neuropeptide Y (NPY)-ergic systems in a rat model of post-traumatic stress disorder. **Animal Cells and Systems**, v. 22, p. 109-117, 2018
- LEMONICA, I. P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M. T. V.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Manual de teratogênese**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2001.
- MANCEBO-CAMPOS, V.; SALVADOR, M. D.; FREGAPANE, G. Antioxidant capacity of individual and combined virgin olive oil minor compounds evaluated at mild temperature (25 and 40 °C) as compared to accelerated and antiradical assays. **Food Chemistry**, v. 150, p. 374-381, 2014.
- MARKIN, D.; DUEK, L.; BERDICEVSKY, I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. **Mycoses**, v. 46, p. 132-136, 2003.
- MAURISSEN, J. P. J.; MARABLE, B. R.; ANDRUS, A. K.; STEBBINS, K. E. Factors affecting grip strength testing. **Neurotoxicology and teratology**, v. 25, p. 543-553, 2003.
- MCDONALD S.; PRENZLER P. D.; ANTOLOVICH M.; ROBARDS K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**, v.73, p. 73-84, 2001.
- MEINERZ, A. R. M.; CLEFF, M. B.; NASCENTE, P. S. Esporotricose felina, micose de interesse em saúde pública. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 29, p. 174-176, 2007.
- MELLO, J. R. B.; MELLO, F. B.; LANGELOH, A. Estudo de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápico Contendo *Gentiana lutea*, *Rheum palmatum*, *Aloe ferox*, *Cynara scolymus*, *Atropa beladonna*, *Peumus boldus* e *Baccharis trimera*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 10-16, 2008.
- MELLO, J. R. B.; MELLO, F. B.; LANGELOH, A. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Aloe ferox*, *Quassia amara*, *Cynara scolymus*, *Gentiana lutea*, *Peumus boldus*,

Rhamnus purshiana, *Solanum paniculatum* e *Valeriana officinalis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, Porto Alegre, v.28, p.183-91, 2008

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. **Brazilian Journal of Food & Nutrition**/Alimentos e Nutrição, v. 23, n. 4, 2012.

MELLO, M.S.C. Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos. 131f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária), **Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro/RJ, 2007.

MICOL V.; CATURLA N.; PÈREZ-FONS L.; MÁ S V.; PÈREZ, L.; ESTEPA A. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). **Antiviral Research**, v. 66, p 129-136, 2005.

MOTZ, B. A.; ALBERTS, J. R. The validity and utility of geotaxis in young rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, p. 529-533, 2005.

NESTOR, A.; HANDEL, M. A. The transport of morphologically abnormal sperm in the female reproductive tract of mice. **Gamete Research**, v. 10, p. 119-125, 1984.

OBIED, H. K.; BEDGOOD JR, D. R.; PRENZLER, P. D.; ROBARDS, K. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 603, p. 176-189, 2007.

OBIED, H. K.; PRENZLER, P. D.; OMAR, S. H.; ISMAEL, R.; SERVILI, M.; ESPOSTO, S.; TATICCHI, A.; SELVAGGINI, R.; URBANI, S. Chapter Six - Pharmacology of Olive Biophenols. In: FISHBEIN, J. C. (ed), **Advances in Molecular Toxicology**, Elsevier, v. 6, p. 195-242, 2012.

OECD Guideline for the Testing of Chemicals 416, **Two Generation Reproduction Toxicity Study**, 2001.

OLISSUL, 2021 – Associação dos Olivicultores do Sul do Brasil. Ficha da Oliveira. Disponível em: http://www.olivicultura-rs.com.br/conhec_oliveira.html (Acesso em: 31 jan. 2021).

OSÓRIO, L.G. Avaliação da atividade anti-*Aspergillus* do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. in vivo e in vitro em frangos. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS, 2014.

ÖZCAN, M. M.; MATTHÄUS, B. A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. **European Food Research and Technology**, V. 243, P. 89-99, 2017.
PASSOS, M. C. F.; RAMOS, C. F.; MOURA, E. G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, V. 20, n. 11, p. 1603-1612, 2000.

PEREIRA, F. O. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero trichophyton. 119f. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Universidade Federal de Pernambuco, João Pessoa, 2009.

PEREIRA, A. P.; FERREIRA, I. C. F. R.; MARCELINO, F.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A.; PEREIRA, J. A. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves, **Molecules**, v. 12, p. 1153-1162, 2007.

- PERUGINI, P.; VETTOR, M.; RONA, C.; TROISI, L.; VILLANOVA, L.; GENTA, I.; CONTI, B.; PAVANETTO, F. Efficacy of oleuropein against UVB irradiation: preliminary evaluation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, p.113-120, 2008.
- PIFFER, R.C.; GARCIA, P.C.; GERARDIN, D.C.; KEMPINAS, W.G.; PEREIRA, O.C. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. **Reprod. Fertil. Dev.** v.21, p.634-639, 2009.
- QUIÑONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v. 68, p. 125-131, 2013.
- RAHMANIAN, N.; JAFARI, S. M.; WANI, T. A. Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. **Food Science & Technology**, v. 42, p. 150-170, 2015.
- RANALLI, A.; CONTENTO, S.; LUCERA, L.; DI FEBBO, M.; MARCHEGIANI, D.; DI FONZO, V. Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 434-440, 2006.
- RAPOPORT, H. F.; Botánica y morfología. In: BARRANCO, D.; FERNANDÉZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. **El cultivo del olivo**. 2ed. Madri, Mundi-Prensa-Junta de Andalucía, p.651, 1998.
- REDI, C. A.; GARAGNA, S.; PELLICCIARI, C.; MANFREDI ROMANINI, M. G.; CAPANNA, E.; WINKING, H.; GROPP, A. Spermatozoa of chromosomally heterozygous mice and their fate in male and female genital tracts. **Gamete Research**, v. 9, p. 273-286, 1984
- RIPOLL, M. K. Potencial antifúngico de *Olea europaea* frente a fungos leveduriformes e filamentosos. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.
- ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adults rats. **J. Reprod. Fert.** v.54, p.103-107, 1978.
- ROBINSON, S. R.; BRUMLEY, M. R. Prenatal behavior. In: WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. **The behavior of the laboratory rat**. Oxford: Oxford University press., 2005. P. 257-265.
- RODRIGUES-ALVES, P. S. B. Interferência da Moxidectina na motivação sexual e ereção peniana de ratos: envolvimento de neurotransmissores hipotalâmicos e estriatais. 2007. Dissertação (Doutorado em Psicologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, v. 31, p. 7-12, 2010.
- ROMAN, S. S.; DAMBROS, A.; ROSSET, A.; PISTORE, M.; SCHIMID, A. R.; CANSIAN, R. L. Toxicidade materna e reprodutiva de extrato hidroalcoólico de *Sonchus oleraceus* L. em ratos Wistar. **Perspectiva**, v.38, p. 69-77, mar., 2014.
- ROSTAMZADEH, A.; AMINI-KHOEI, H.; KORANI, M. J. M.; RAHIMI-MADISEH, M. Comparison effects of olive leaf extract and oleuropein compounds on male reproductive function in cyclophosphamide exposed mice. **Heliyon**, v. 6, p. 1-6, 2020.
- SANTIN, R.; MADRID, I.; MATOS, C.B.; FREITAG, R.; MEIRELES, M. C. A.; CLEFF, M. B.; MELLO, J. R. B. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 66, p. 367-373, 2014.

- SAHIN, S.; BILGIN, M.; DRAMUS, M. U. Investigation of Oleuropein Content in Olive Leaf Extract Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Soxhlet Methods. **Separation Science and Technology**, v. 46, p. 1829-1837, 2011.
- SANTOS, B. F. Criação e manejo de ratos. *In*: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, p. 119-121, 2002. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf> (Acesso em: 31 jan. 2021)
- SANTOS, L. D. Avaliação da Toxicidade Reprodutiva do Óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis* L. em Ratos Wistar. 2017. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- SARFARAZ, S.; BANO, T.; KHALID, H.; ZAFAR, A.; ATIQUE, A.; RASHID, A. Anxiolytic effect of olive leaf tea on mice. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 193-198, 2019.
- SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. *In*: ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G. MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000. 891p.
- SINGH, I.; MOK, M.; CHRISTENSEN, A. M.; TURNER, A. H.; HAWLEY, J. A. The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, V. 18, P. 127-132, 2008.
- SNOERE, E. M. S.; VEENING, J. G.; OLIVIER, B.; OOSTING, R. Serotonin 1A receptors and sexual behavior in female rats: A review. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 121, p. 43-52, 2014.
- SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C.; WICHERS, H. J. Oleuropein and related compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1013-1023, 2000.
- TASSOU C. C.; NYCHAS G. J. E. Inhibition of Salmonella enteritidis by oleuropein in growth broth and in a model food system. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 120-124, 1995.
- TRANter, H. H.; TASSOU, S. C.; NYCHAS, G. J. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by Staphylococcus aureus. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 253-259, 1993.
- TUCK K. L.; HAYBALL P. J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 636-644, 2002.
- U.S. Environmental Protection Agency, USEPA. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**. (EPA/630/R-96/009), Washington, Federal Register v. 61, n. 212, p. 56274-56322, 1996.
- VANDENBERGH, J. G. Acceleration of sexual maturation in female rats by male stimulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 46, p. 451-453, mar. 1976.

- VARGAS, P. GARMENDIA, M. F.; HESS, J.; KADEREIT, J. *Olea europaea* subsp. *guanchica* and subsp. *maroccana* (Oleaceae), two new names for olive tree relatives. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 58, p. 360-361, 2000.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, fev. 2005.
- VEIGA JR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de farmacologia**, v. 18, p. 308-313, 2008.
- VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, p. 18-23, 2011.
- VISIOLI, F.; POLI, A.; GALLI, C. Antioxidant and Other Biological Activities of Phenols from Olives and Olive Oil. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, p. 65-75, 2002.
- WALLANDER, E.; ALBERT, V. A. Phylogeny and classification of oleaceae based on *RPS16* and *TRNL-F* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 87, p. 1827-1841, 2000.
- WALLER, S.B. Potencial anti-Sporotrix spp. de plantas da família Lamiaceae. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS, 2015.
- WALLER, S. B.; HOFFMANN, J.; MADRID, I.M.; PICOLI, T.; CLEFF, M. B.; CHAVES, F.; ZANETTE, R. A.; MELLO, J. R. B.; FARIA, R.O.; MEIRELES, M. C. A. Polar *Origanum vulgare* (Lamiaceae) extracts with antifungal potential against *Sporothrix brasiliensis*. **MEDICAL MYCOLOGY**. v. 56, p. 225-233, 2017.
- WEBER, D. N. Mechanisms of Behavioral Toxicology: An Integrated Approach. **American Zoologist**, v. 37, p. 343-345, nov. 1997.
- WEINBERG, J.; SLIWOWSKA, J. H.; LAN, N.; HELLEMANS, K. G. C. Prenatal Alcohol Exposure: Foetal Programming, the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Sex Differences in Outcome. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, p. 470-488, 2008.
- WILSON, J. C. Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animal. In: WILSON, J. C.; WARKANY, J. (eds). **Teratology: principles and techniques**. Chicago: University of Chicago Press, 1965, p. 265-327.
- WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. **The behavior of the laboratory rat**. Oxford: Oxford University press. 2005.
- WHO. **Organización Mundial de la Salud Ginebra**. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. 2011.
- WREGGE, M.S.; COUTINHO, E.F.; STEINMETZ, S.; REISSER JUNIOR, C.; ALMEIDA, I.R.; MATZENAUER, R.; RADIN, B. Zoneamento agroclínico para oliveira no Estado do Rio Grande do Sul. Pelotas. **Embrapa Clima Tempo**. 2009.
- WREGGE, M.S.; COUTINHO, E.F.; PANTANO, A.P.; JORGE, R.O. Distribuição potencial de oliveiras no Brasil e no Mundo. **Rer. Bras. Frut.** v. 37, n. 3, p. 656-666, 2015.
- YAO, J., WU, J., YANG, X., YANG, J., ZHANG, Y, DU, L. Oleuropein induced apoptosis in HeLa cells via a mitochondrial apoptotic cascade associated with activation

of the c-Jun NH₂-Terminal kinase. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 125, n. 3, p. 300-311, 2014.

ZBIDI, H.; SALIDO, S.; ALTAREJOS, J.; PEREZ-BONILLA, M.; BARTEGI, A.; ROSADO, J. A.; SALIDO, G. M. Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. **Blood Cell, Molecules, and Disease**, v. 42, p. 279-285, 2009.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: A risk of assessment approach. *In*. HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1989.

ANEXO 1



Add: D404.Pioneering Park, No. 69 Jinye Road,
Xi'an Hi-tech Development Zone, Xi'an, China
Tel: +86-29-88259472 Fax: +86-29-88217317
www.gls-source.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product name Olive Extract Powder
Botanical source *Olea Europaea L.*
Used Part: Leaf
Batch Number: OE180512 **Batch Quantity:** 650kg
Manufacture Date: May. 12, 2018 **Certificate Date:** May. 22, 2018
Expiry Date: May. 11, 2020

ANALYSIS	SPECIFICATION	RESULTS
Appearance	Yellow Brown Fine powder	Complies
Odor	Characteristic	Complies
Taste	Characteristic	Complies
Assay(HPLC)	Oleuropein $\geq 40.00\%$	40.63%
Mesh Size	95% pass 80 mesh	Complies
Loss on Drying	$\leq 5.0\%$	3.21%
Residue on Ignition	$\leq 5.0\%$	3.08%
Heavy Metal	$< 10\text{ppm}$	Complies
Pb	$< 3\text{ppm}$	Complies
Cd	$< 1\text{ppm}$	Complies
Hg	$< 0.1\text{ppm}$	Complies
As	$< 2\text{ppm}$	Complies
Microbiology		
Total Plate Count	$< 10000\text{cfu/g}$	Complies
Yeast & Mold	$< 1000\text{cfu/g}$	Complies
E.Coli	Negative	Complies
Escherichia coli	Negative	Complies
Salmonella	Negative	Complies

Conclusion Conform with specification

Storage Store in sealed containers at cool & dry place.
Protect from light, moisture and pest infestation.

Shelf life 2 years when properly stored

Analyst: Feng QingShuang

Corrector: Guo Shasha

Feng Qingshuang

Guo ShaSha

ANEXO 2

A amostra comercial adquirida da empresa chinesa XI'AN GREEN SOURCE CO., LTD, era descrita como um composto de folhas de *Olea europaea* L. em pó, contendo 40% de oleuropeína e 3,21% de umidade (Anexo 1).

A amostra foi analisada por diferentes ferramentas analíticas, como ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de ultravioleta (UV), (Figura 1 a 6).

As análises mono e bidimensionais de RMN foram realizadas em um equipamento Bruker Ascend 400 (Billerica, EUA). A amostra foi diluída em metanol deuterado (Sigma, EUA). Os espectros de RMN obtidos para a amostra contendo oleuropeína estão de acordo com os resultados descritos por Ibrahim *et al.* (2017) para o mesmo composto.

Para a análise de EM, a amostra foi injetada diretamente em um equipamento QTOF (microTOF-QII Bruker Daltonics) com ionização por eletrospray (ESI). A análise foi realizada no modo negativo, utilizando N₂ a 200°C, fluxo de gás de 8 L/min, voltagem do capilar de 4000 eV e energia de ionização de 3 eV. Foi realizada uma varredura da amostra na faixa de 100 a 1000 *m/z*. O composto oleuropeína presente na amostra foi identificado de acordo com o seu valor de massa exata de alta resolução e com o perfil de fragmentação dos íons. Os espectros de massas obtidos em modo negativo para oleuropeína apresentam semelhança com os obtidos por Barón *et al.* (2015) e Quirantes-Piné *et al.* (2013).

As análises de CLAE-UV foram realizadas em um equipamento da marca Waters (modelo e2695) acoplado a um detector de arranjo de diodos (Waters 2998). Para a separação dos compostos presentes na amostra, foi utilizada uma coluna de fase reversa (Kinetex→ Column 5u, C18; 100A, 250 x 4,60 mm). Água e acetonitrila acidificada com 0,08% (v/v) de ácido trifluoroacético foram utilizados como fase móvel A e B, respectivamente. O gradiente de A variou de 95 a 90, de 0 a 10 minutos, de 90 a 80, de 10 a 20 minutos, se manteve em 80 por 10 minutos, variou de 80 a 70, de 30 a 35 minutos, de 70 a 60, de 35 a 40 minutos, de 60 a 50, de 40 a 45 minutos, de 50 a 40, de 45 a 50 minutos, de 40 a 30, de 50 a 55 minutos, de 30 a 20, de 55 a 60 minutos, de 20 a 10, de 60 a 65 minutos e de 10 a 95, de 65 a 80 minutos. O fluxo utilizado foi de 0,7 mL/minutos e o volume de injeção foi de 10 µL. A amostra contendo oleuropeína foi injetada na concentração de 1000 µg/mL e observada em uma faixa de 210 a 400 nm.

Figura 1 – Espectro de ^1H -RMN da amostra (400 MHz, MeOD). Neste tipo de espectro é possível obter informações a respeito dos átomos de hidrogênio da molécula que estão ligados a átomos de carbono.

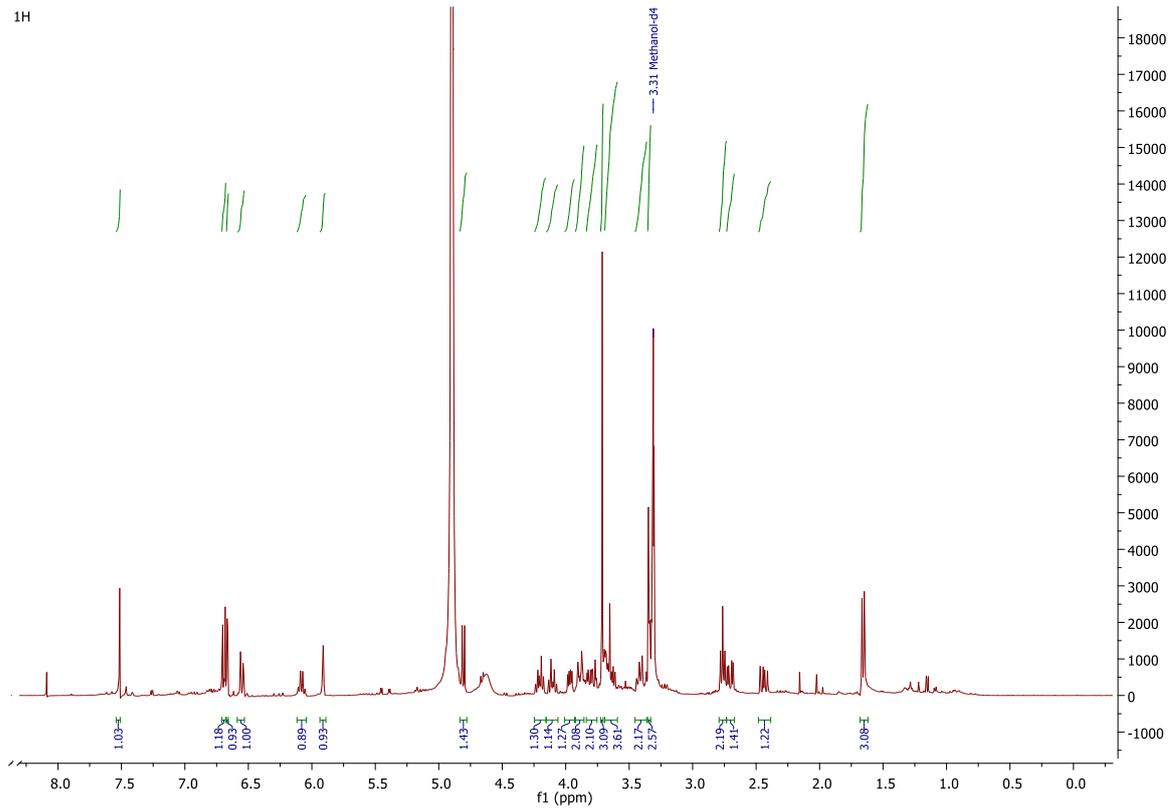


Figura 2 – Espectro de ^{13}C -RMN da amostra (100 MHz, MeOD). Neste tipo de espectro é possível obter informações a respeito dos átomos de carbono da molécula.

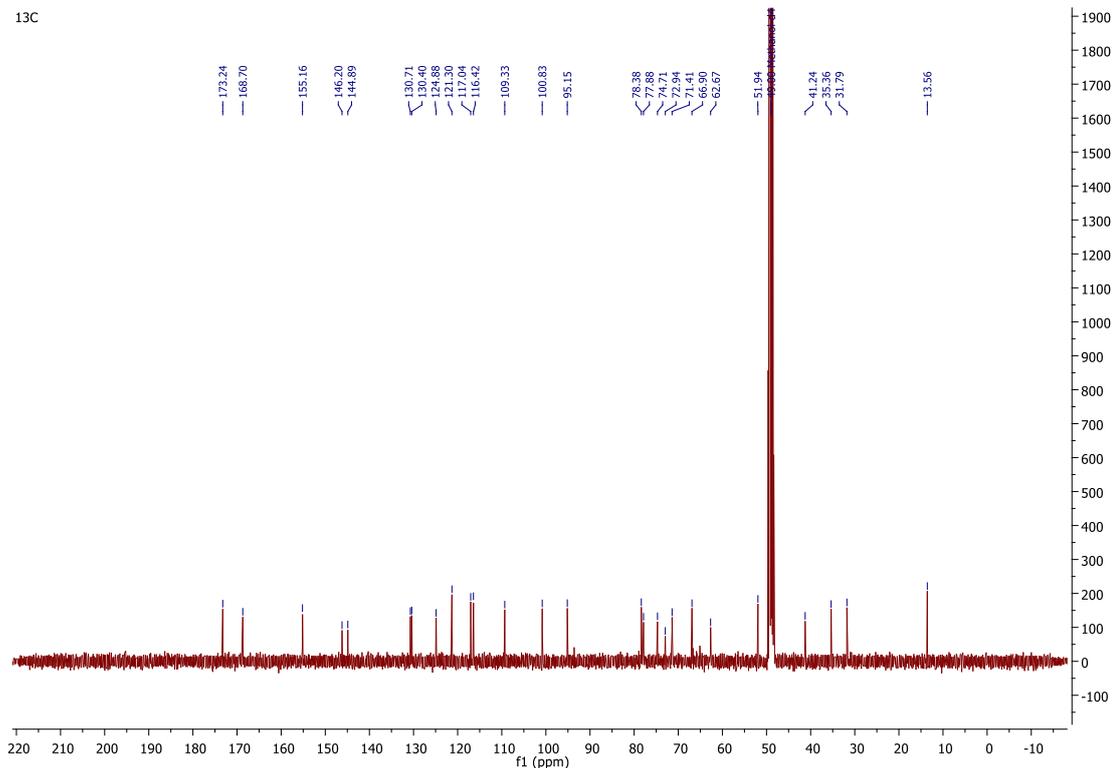


Figura 3 – Espectro de massas da amostra através de injeção direta por Q-tof-ESI-MS, modo negativo. Neste tipo de espectro é possível obter informação a respeito da massa molecular do composto.

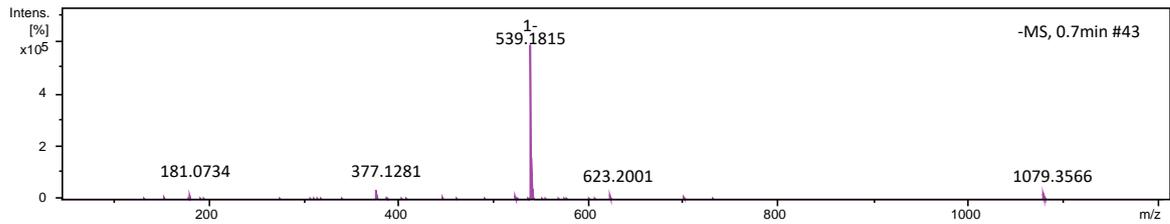


Figura 4 – Padrão de fragmentação da oleuropeína por Q-tof-ESI-MS, modo negativo. Neste tipo de espectro é possível obter informações a respeito do perfil de fragmentação da amostra analisada.

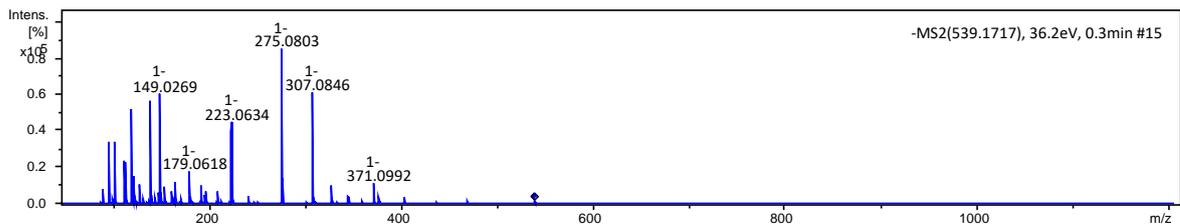


Figura 5 – Cromatograma da amostra por CLAE-DAD (210-400 nm). Neste tipo de análise, é possível obter informações do perfil cromatográfico da amostra analisada, observando a presença do composto de interesse (majoritário), assim como de outras substâncias minoritárias.

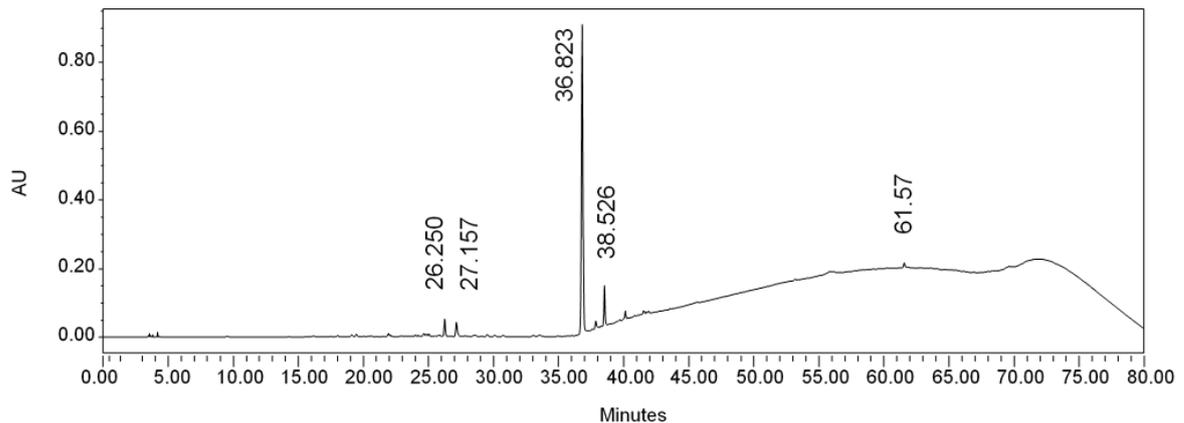
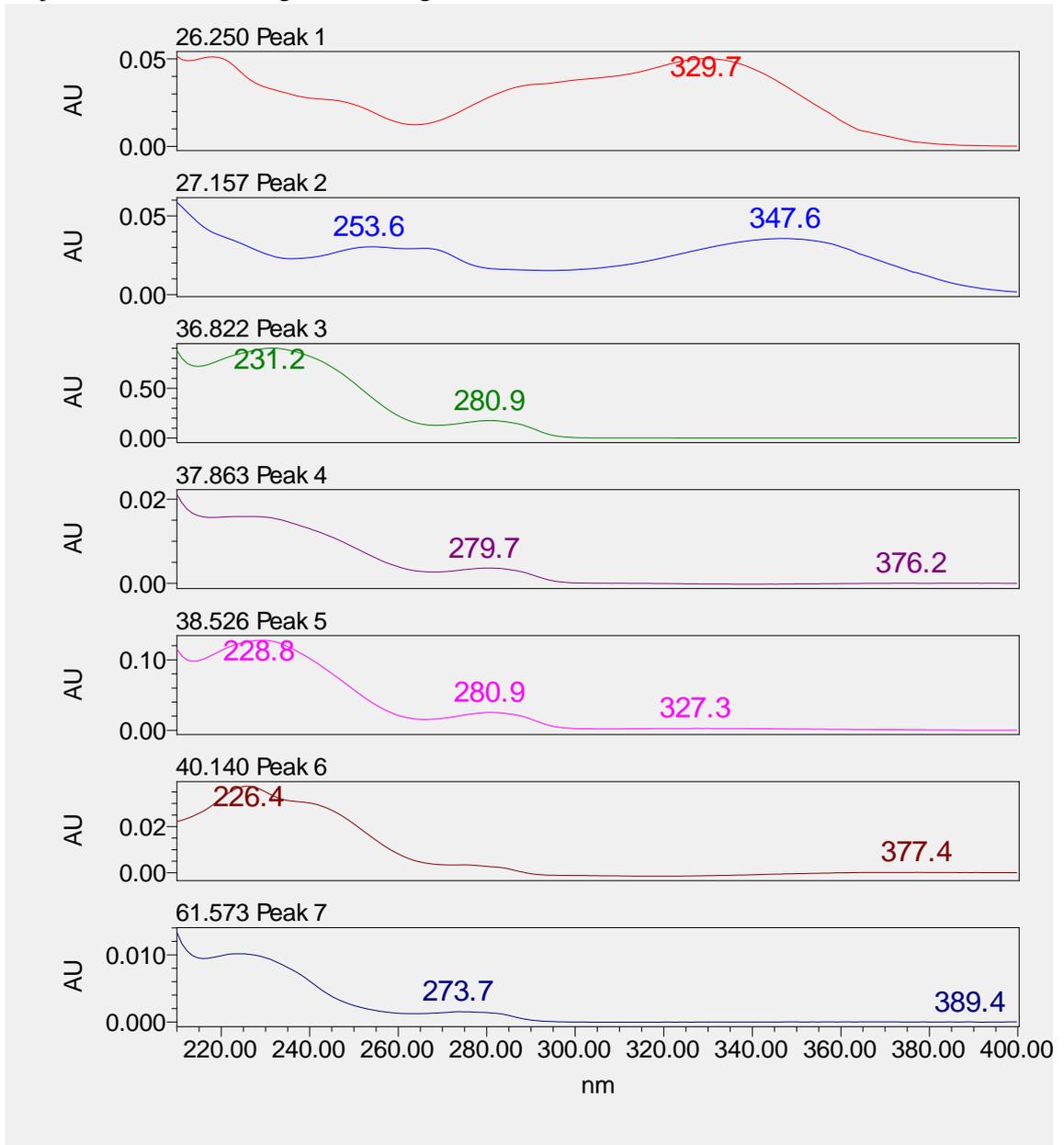


Figura 6 – Espectros de UV dos picos observados no cromatograma da amostra por CLAE-DAD (210-400 nm). Em verde, é possível observar o espectro de UV do pico majoritário do cromatograma da Fig. 5.



ANEXO 3



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37284

Título: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PERI E PÓS-NATAL (Segmento III) do óleo essencial de *Olea europaea* em Ratos Wistar

Vigência: 07/05/2019 à 28/02/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

JOAO ROBERTO BRAGA DE MELLO - coordenador desde 07/05/2019
FERNANDA BASTOS DE MELLO - pesquisador desde 07/05/2019
RAQUEL LUÍSA BREUNIG - Aluno de Mestrado desde 07/05/2019
MURIEL RODRIGUES FERRAZ DE OLIVEIRA - Aluno de Mestrado desde 07/05/2019
Gisele Barcelos Seberino - Aluno de Mestrado desde 07/05/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 10/06/2019 - Sala 219 C do Prédio do Instituto de ciências Básicas da Saúde - ICBS - Campus Centro UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre/RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 480 machos e 480 fêmeas, totalizando 960 filhote de ratos Wistar, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 21 de Junho de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética