

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA  
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO TOXICOLOGIA OCUPACIONAL E AMBIENTAL

**ESTUDO DA EMBRIOTOXICIDADE DA BETA-IONONA  
EM RATOS**

FLÁVIA CRISTINA MORONE PINTO

RIO DE JANEIRO  
2005

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA  
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO TOXICOLOGIA OCUPACIONAL E AMBIENTAL

## **ESTUDO DA EMBRIOTOXICIDADE DA BETA-IONONA EM RATOS**

Dissertação apresentada à Escola Nacional de  
Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz – para  
obtenção do grau de Mestre em Saúde Pública –  
área de concentração em Toxicologia

FLÁVIA CRISTINA MORONE PINTO

Rio de Janeiro  
2005

## Ficha Catalográfica

Pinto, Flávia Cristina Morone

Estudo da Embriotoxicidade da Beta-ionona em Ratos / Flávia Cristina Morone Pinto  
– 2005

xiv, p. 81

Orientadores: Isabella Fernandes Delgado e Francisco José Roma Paumgarten

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública  
Sérgio Arouca, Julho de 2005

1. Beta-ionona 2. Embriotoxicidade 3. Toxicidade materna

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA  
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO TOXICOLOGIA OCUPACIONAL E AMBIENTAL

## **ESTUDO DA EMBRIOTOXICIDADE DA BETA-IONONA EM RATOS**

FLÁVIA CRISTINA MORONE PINTO

Orientadores: Isabella Fernandes Delgado e Francisco José Roma  
Paumgartten

Aprovada em 15 de Julho de 2005 pela banca examinadora:

Prof. Dr. João Carlos de Souza Côrtes (externo)  
Prof. Dr.<sup>a</sup>. Cláudia Garcia Serpa Osorio de Castro (interno)  
Prof. Dr.<sup>a</sup>. Isabella Fernandes Delgado (orientadora)  
Prof. Dr.<sup>a</sup>. Silvana do Couto Jacob (suplente interno)  
Prof. Dr.<sup>a</sup>. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (suplente externo)

Rio de Janeiro  
2005

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores – Isabella e Francisco – pelos ensinamentos, dedicação e zelo.

A Rosangela pela capacidade que tem de transmitir seus conhecimentos de forma simples e clara, mas com muita responsabilidade e amor pelo que faz.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia pela amizade e carinho.

A Secretaria Acadêmica da ENSP pela seriedade e respeito dispensados.

A FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

“O que distingue um mestre de um professor é a necessidade que tem o primeiro de doar e tornar o conhecimento indispensável, pois aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci  
(cientista e pintor italiano)

## ÍNDICE

Lista de Tabelas .....	ix
Lista de Figuras .....	x
Lista de Quadros .....	xi
Lista de Abreviaturas .....	xii
Resumo .....	xiii
Abstract .....	xiv
1. Introdução.....	1
1.1 Distribuição da Beta-ionona.....	3
1.2 Constituintes dos óleos essenciais.....	5
1.3 Importância industrial dos óleos essenciais e seus constituintes.....	6
1.4 Toxicologia Reprodutiva.....	7
1.4.1 História da Teratologia.....	7
1.4.2 Bases da Toxicidade Reprodutiva Moderna.....	11
1.4.2.1 Teratógenos Humanos.....	14
1.4.3 Diretrizes de estudos pré-clínicos de avaliação da toxicidade reprodutiva.....	16
2. Objetivos.....	21
3. Materiais e Métodos.....	22
3.1 Teste Piloto.....	22
3.2 Animais.....	23
3.3 Acasalamento.....	23
3.4 Tratamento.....	24
3.5 Cesariana.....	25
3.6 Análise Visceral.....	26
3.7 Análise Esquelética.....	27
3.8 Análise Estatística.....	28
3.9 Reagentes .....	29
3.10 Preparo de Soluções .....	31
4. Resultados.....	32
4.1 Toxicidade Materna.....	32
4.2 Embriotoxicidade.....	36
4.2.1 Embrioletalidade.....	36

4.2.2	Crescimento Intra-Uterino .....	39
4.2.3	Razão entre Fetos Machos e Fêmeas .....	41
4.2.4	Alterações Morfológicas .....	41
4.2.4.1	Alterações visíveis externamente.....	41
4.2.4.2	Alterações viscerais.....	42
4.2.4.3	Alterações ósseas.....	45
5.	Discussão.....	60
5.1	Toxicidade Materna .....	60
5.2	Embriotoxicidade.....	63
5.2.1	Embriotoxicidade: embriofetividade.....	64
5.2.2	Embriotoxicidade: efeitos sobre o crescimento intra-uterino.....	68
5.2.3	Embriotoxicidade: alterações morfológicas.....	69
5.3	Considerações finais.....	70
6.	Conclusões.....	73
7.	Bibliografia.....	74



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Ganho de peso materno de ratas tratadas com Beta-ionona (0, 125, 250, 500 e 1000mg/kg peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 15 de gestação.....**33**
- Tabela 2** – Sinais de toxicidade notados nas fêmeas tratadas com Beta-ionona.....**35**
- Tabela 3** – Parâmetros avaliados durante a cesareana de ratas tratadas com Beta-ionona (0, 125, 250, 500 e 1000mg/kg peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 15 de gestação.....**38**
- Tabela 4** – Peso dos órgãos de fetos tratados com beta-ionona do dia 6 ao dia 15 de gestação..... **40**
- Tabela 5** – Ocorrência de anomalias viscerais em ninhadas de ratas tratadas oralmente com beta-ionona (0, 125, 250, 500 e 1000mg/kg de peso corporal) do dia 6 ao dia 15 de gestação..... **43**
- Tabela 6** – Malformações esqueléticas em ninhadas de ratas tratadas oralmente com beta-ionona (0, 125, 250, 500 e 1000mg/kg de peso corporal) do dia 6 ao dia 15 de gestação..... **48**
- Tabela 7** – Análise comparativa da toxicidade materna e da embriotoxicidade induzida em ratos Wistar pela Beta-ionona (BI) após tratamento com dose única ou após tratamento com doses repetidas durante todo o período de embriogênese..... **67**
- Tabela 8** – Análise comparativa dos resultados de estudos de embriotoxicidade de terpenóides em ratos..... **71**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura Química Beta-ionona.....	2
<b>Figura 2</b> - Variedades de Boronia.....	4
<b>Figura 3</b> - Estatueta de Mármore de 6500 AC.....	8
<b>Figura 4</b> - Tábuas de Nineveh.....	9
<b>Figura 5</b> - Os Frutos da Hibridização segundo Fortunius Licetus.....	12
<b>Figura 6</b> – Fígado com lóbulo extra.....	53
<b>Figura 7</b> - Forma irregular do lóbulo medial esquerdo do fígado .....	53
<b>Figura 8</b> – Pulmão com lóbulo extra.....	53
<b>Figura 9</b> - Ausência do testículo esquerdo.....	54
<b>Figura 10</b> - Epidídimo com forma irregular.....	54
<b>Figura 11</b> - Posição irregular da glândula adrenal (1).....	54
<b>Figura 12</b> - Posição irregular da glândula adrenal (2).....	55
<b>Figura 13</b> - Alteração no tamanho do fígado (hepatomegalia) .....	55
<b>Figura 14</b> - Lóbulo pulmonar com fissuras .....	55
<b>Figura 15</b> - Cisto próxima ao rim direito .....	56
<b>Figura 16</b> - Ureter dilatado e tortuoso .....	56
<b>Figura 17</b> - Osso basisfenóide com forma irregular .....	57
<b>Figura 18</b> - Osso supraoccipital com forma irregular .....	57
<b>Figura 19</b> - Costela adicional rudimentar na coluna cervical .....	57
<b>Figura 20</b> – Esternebras não-alinhadas.....	58
<b>Figura 21</b> - Escápula tortuosa.....	58
<b>Figura 22</b> - Costelas tortuosas .....	58
<b>Figura 23</b> - Polidactilia.....	59
<b>Figura 24</b> - Ganho médio de peso em ratas tratadas com beta-ionona no período entre os dias 6 e 15 de gravidez.....	62

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Resumo dos Protocolos Regulatórios <i>in vivo</i> para avaliação da toxicidade sobre o desenvolvimento .....	<b>20</b>
---	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

*ad libitum* – a vontade

ANOVA – Análise de variância (estatística)

BI – Beta-ionona

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

EEC – Comunidade Econômica Européia

*et al* – e colaboradores (*et ali*)

FDA – Agência de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

*i.e.*- isto é (“*id est*”)

ICH – Conferência Internacional de Harmonização

IDA – Ingestão Diária Aceitável

IPCS – Programa Internacional de Segurança de Químicos

JMPR – *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*

NOAEL – *No Observed Adverse Effect Level*

OECD – Organização para Cooperação Econômica e sobre o Desenvolvimento

*per se* – por si só

US EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

WHO – Organização Mundial de Saúde

## RESUMO

Beta-ionona (4-[2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl]-3-buten-2-one; CAS 79-77-6) é um sesquiterpeno degradado (C13) encontrado nos óleos essenciais de uma variedade de plantas, entre os quais o óleo de violeta. Este composto tem sido usado na indústria, como intermediário na síntese de fragrâncias, vitamina A e como aditivo alimentar, sobretudo na indústria de vinhos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial embriotóxico da beta-ionona que, em estudos anteriores, mostrou claros indícios de induzir embriofetalidade em ratos. Ratas Wistar foram tratadas por entubação gástrica com beta-ionona (125, 250, 500 e 1000 mg/kg de peso corporal/dia) ou apenas com veículo (óleo de milho), entre os dias 6 e 15 de gravidez. No dia 21, as fêmeas foram sacrificadas por inalação de CO<sub>2</sub> e submetidas à cesárea. O útero gravídico foi pesado com todo seu conteúdo. Foram contados os corpos lúteos gravídicos, os fetos vivos e mortos e as reabsorções. As implantações foram determinadas pelo método de Salewski. Os fetos foram examinados e pesados, sendo 1/3 dos fetos de cada ninhada fixado em solução de *Bouin* para análise de vísceras, e os 2/3 restantes, diafanizados e corados com Alizarina Red S para exame de alterações de esqueleto.

A beta-ionona, na dose de 1000mg/kg de peso corpóreo/dia, causou discreta toxicidade materna, constatada pela redução de ganho de peso das mães durante o tratamento e pelo aparecimento de sinais clínicos de toxicidade. Neste nível de dose, a beta-ionona também afetou adversamente o desenvolvimento embrionário, causando embriofetalidade, evidenciada pelo aumento de perdas peri-implantação e pelo discreto aumento na proporção de reabsorções por implantações. Ainda em relação ao efeito embriofetal da beta-ionona observado neste estudo, pode-se dizer que as fêmeas foram mais suscetíveis do que os machos. No presente estudo, não foram encontrados indícios de retardo do crescimento intra-uterino induzido pela exposição *in utero* à beta-ionona, nem aumento na incidência de alterações estruturais de vísceras ou esqueléticas em nenhum dos níveis de dose estudados. Os dados deste estudo indicaram que a beta-ionona não é teratogênica em ratos, uma vez que não houve aumento na frequência de malformações viscerais e/ou esqueléticas em consequência à exposição *in utero* a este composto.

Nestas condições experimentais, o nível máximo de dose em que não são observados efeitos adversos pode ser fixado em 500 mg de beta-ionona/kg de peso corporal, *i.e.* NOAEL=500 mg de beta-ionona/kg.

## ABSTRACT

$\beta$ -ionone (4-[2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl]-3-buten-2-one) is a degraded (C13) sesquiterpene found in a variety of plants including *Boronia megastigma* as well as in the violet oil. It has been used as an intermediate in the synthesis of fragrance chemicals and as food flavouring additive.  $\beta$ -Ionone ring is also found in the molecular structure of retinoic acid,  $\beta$ -carotene and vitamin A.

This study is undertaken to investigate the embryotoxic potential of  $\beta$ -Ionone in the rat.  $\beta$ -Ionone (125, 250, 500 and 1000mg/kg) was dissolved in corn oil and given by gavage to Wistar rats once a day from day 6 to 15 of pregnancy. A control group received only corn oil. All rats were weighed on days 0, 6 up to 15 and 21 of pregnancy. On day 21 of pregnancy all dams were anesthetized and killed by CO<sub>2</sub> inhalation. The gravid uterus was weighed with its contents and the number of resorptions, implantation sites (Salewski's method) and live and dead fetuses was recorded. The living fetuses were weighed, numbered and examined for externally-visible malformations. One-third of each litter was fixed in Bouin's solution and examined for soft tissue anomalies and the remaining fetuses were stained with Alizarin red S for skeleton evaluation.

A decrease in pregnancy body weight gain during the treatment period and the appearance of clinical signs of toxicity indicate that the highest dose of  $\beta$ -Ionone tested (1000mg/kg body weight) was slightly toxic to the mother. The pronounced reduction in the ratio of pregnant (*i.e.* rats with implantation sites detected at pregnancy day 21)/treated (*i.e.* sperm positive treated rats) suggests that the highest dose of  $\beta$ -Ionone produced a substantial number of prenatal losses at the beginning of the treatment period. It is noteworthy that  $\beta$ -Ionone, even at doses as high as 1000mg/kg body weight, did not cause any gross structural malformation.

In conclusion,  $\beta$ -Ionone was only slightly toxic to mothers and embryos, and no sign of teratogenicity was found. From the data present in this study the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) for  $\beta$ -Ionone-induced embryotoxicity can be set at 500mg/kg body weight.

## 1. INTRODUÇÃO

---

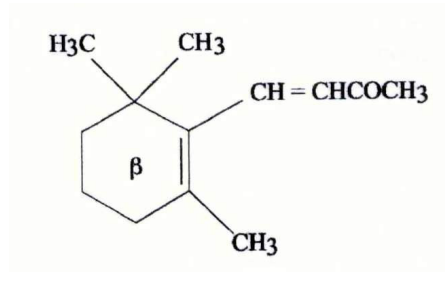
A beta-ionona (4-[2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl]-3-buten-2-one; Figura 1) é um sesquiterpeno (terpenóide degradado - C13) presente em óleos voláteis (ou essenciais) de uma variedade de plantas, incluindo o óleo de violeta (*Viola glabella* e a *Viola sempervirens*) e de *Boronia megastigma* – Rutaceae (Banthorpe, 1994).

A ISO (*International Standard Organization*) define óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (*Rutaceae*). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamadas de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas como, por exemplo, a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo daí a designação de *óleo*. Entretanto, a sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se assim dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo por isso também chamados de essências (Simões et al., 2000).

Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que esses últimos preponderam. Os fenilpropanóides formam-se a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico (Simões et al., 2000). Já os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo que esse termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de uma unidade básica do isopreno (ou hemiterpeno - C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Assim, a partir desta estrutura simples de 5 átomos de carbono, as plantas sintetizam

uma extraordinária variedade de compostos terpenóides que, de acordo com o número de unidades de isopreno presentes, são denominadas monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ), triterpenos ( $C_{30}H_{48}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}H_{64}$ ) e politerpenos ( $C_{n5} H_{n8}$ ).

**Figura 1: Estrutura Química da Beta-Ionona**



Os terpenóides estão presentes em plantas alimentícias e medicinais e, além disso, são amplamente utilizados em produtos cosméticos, como aromatizantes em alimentos, como essências em vários produtos domissanitários e como ingredientes de uma variedade de medicamentos de venda livre. No entanto, embora a exposição humana aos terpenóides seja apreciável, a base de dados toxicológicos existente sobre estas substâncias ainda é incipiente, e em grande parte, diz respeito a estudos antigos em que aspectos relevantes para caracterização da toxicidade (*e.g.* potencial mutagênico, carcinogênico, alergênico, embriofetotóxico e teratogênico) não foram adequadamente investigados.

Apesar da escassez de dados toxicológicos sobre os inúmeros componentes químicos de um óleo volátil, sabe-se que alguns óleos tem sido associados a efeitos adversos como, por exemplo, a indução de quadros de hipersensibilidade. Este fato torna-se particularmente preocupante se levarmos em consideração a popularidade de terapias ditas “naturais”, tais como a aromaterapia - definida como o tratamento utilizando ‘aromas’ e óleos essenciais - que estimulam a automedicação e levam à exposição a terpenóides (Tisserand & Balacs, 1995).



O interesse da população geral por terapias ditas “naturais” tem origem na constatação de problemas toxicológicos com produtos sintéticos e, ainda, na crença popular de que produtos de origem natural seriam desprovidos de efeitos nocivos e, portanto, mais “saudáveis” do que os artificiais. Entretanto, a idéia preconcebida de que produtos naturais são, em princípio, mais seguros do que as substâncias sintéticas não se apóia em evidências científicas, havendo numerosos exemplos de substâncias mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas e imunotóxicas de origem natural. Dentre elas, as micotoxinas, os alcalóides pirrolizidínicos, os ésteres do forbol etc. Com relação à avaliação de possíveis efeitos sobre o organismo em desenvolvimento, podemos citar como exemplo substâncias presentes em plantas tais como *Veratrum californicum*, *Conium maculatum*, *Boldus boldus*, *Hypericum perforatum*, *Rosmarinus officinalis* que contém substâncias com reconhecido potencial teratogênico e/ou com ação abortiva.

Portanto, qualquer substância, quer seja ela de origem natural ou sintética, deve ser submetida a amplo estudo toxicológico para que sua segurança seja adequadamente avaliada. Vale ainda ressaltar que, do ponto de vista toxicológico, não importa se um xenobiótico é de origem natural ou sintética, a racionalidade e a metodologia dos estudos de segurança é essencialmente a mesma.

### **1.1 DISTRIBUIÇÃO DA BETA-IONONA**

Além de estar presente nos óleos essenciais de violáceas e espécies de *Boronia sp*, a beta-ionona é ainda encontrada no tomate, no tângelo (híbrido da tangerina - *Citrus reticulata* e do pomelo - *Citrus paradisi*) e no chá-da-Índia.

*Boronia megastigma*, espécie encontrada principalmente da Austrália, é um membro da família das rutáceas, que inclui cerca de 70 espécies (Rangahau, 2001 e Burke's Backyard Archives, 2001). Diferentes variedades de *Boronia* são encontradas, incluindo ‘Harlequin’ (flores marrom e amarela), ‘Lutea’ (flores amarelas) e ‘Jack Macguire's Red’ (flores vermelhas), todas ilustradas na Figura 2. Muitos componentes podem ser identificados no extrato das diferentes espécies de

*Boronia*, em que a beta-ionona é o mais abundante componente da fração volátil, estando presente em concentrações entre 1,2% a 4,5 % (Menary e MacTavish, 2000).

**Figura 2: Variedades de Boronia**



“Harlequin”

“Lútea “

“Jack Macguire’s Red””

Os vários membros da família das violetas possuem flores distintas e dentre as espécies mais conhecidas destacam-se a *Viola glabella* e a *Viola sempervirens*, nativas de jardins. Membros da família *Violaceae* são usados como chás ou extratos medicinais por serem ricos em nutrientes como a vitamina C e o beta-caroteno. O chá ou o extrato podem ser preparados a partir da planta fresca ou seca.

O aroma das rosas é amplamente conhecido por seu perfume. Dentre os mais de 275 constituintes do óleo essencial das rosas, o citronelal é o de maior concentração, *i.e.* 38%. No entanto, produtos derivados da degradação de carotenóides também são encontrados, como a beta-ionona (0,03%) e o beta-damasceno (0,14%). Mesmo que em concentrações menores, estes constituintes produzem significativa contribuição no aroma destas flores (Leffingwell, 2005).

Um anel de beta-ionona está presente na estrutura molecular do ácido retinóico, do retinol e do beta-caroteno (Erickson, 1976). Este último carotenóide tem adquirido papel de destaque em artigos científicos sobre o potencial anti-carcinogênico de compostos naturais, uma vez que estudos epidemiológicos

encontram consistentemente uma associação inversa entre dietas ricas em frutas, legumes e vegetais frescos contendo beta-caroteno e a incidência de câncer de diversas localizações. Estas observações têm sido, em grande parte, corroboradas por dados originários de estudos experimentais e entre os micronutrientes a que se tem atribuído este efeito protetor destacam-se os carotenóides, sobretudo o beta-caroteno e o licopeno, presente no tomate que, como dito anteriormente, também contém beta-ionona (Durnev et al., 1998). Contrastando com os estudos epidemiológicos observacionais do papel da dieta rica em produtos frescos, estudos de intervenção de longa duração não têm encontrado a esperada redução da incidência de câncer em indivíduos que receberam uma suplementação diária de beta-caroteno, como mostram os estudos de Tsuda et al. 1996; Manetta et al., 1996; Clinton et al., 1996; Golding-Lang et al., 1996, Mayne, 1996; Koo, 1997 e Hinds et al., 1997.

## **1.2 CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS**

Os compostos terpênicos mais abundantes nos óleos essenciais são os monoterpenos (cerca de 90%) e os sesquiterpenos. Outros terpenóides, como os diterpenos, são encontrados apenas em óleos essenciais extraídos com solventes orgânicos (Steinegger e Hänsel, 1992).

Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos (alfa-terpineol e terpinoleno) e bicíclicos (alfa-pineno, tujona, cânfora e fenchona). Em cada um desses subgrupos, há ainda outras classificações: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (mentol), aldeídos ou cetonas (mentona, carvona), lactonas (os monoterpenos lactônicos são chamados de iridóides, ex. nepetalactona) e tropolonas (gama-tujaplicina). As variações estruturais dos sesquiterpenos são da mesma natureza que as precedentes, podendo ser acíclicos (farnesol, nerolidol), monocíclicos (ácido abscísico) ou bicíclicos (gama-bisaboleno, beta-selineno, cariofileno) ou lactonas sesquiterpênicas. Em cada um desses subgrupos, classificam-se inúmeras substâncias, caracterizadas por cerca de 200 tipos diferentes de esqueletos. O

número de compostos terpênicos conhecidos ultrapassa a 8.000 (Breitmaier, 1990) enquanto o número dos que tem sido descritos como componentes de óleos voláteis é superior a 150 no caso dos monoterpenos e a 1000 no caso dos sesquiterpenos (Wagner, 1993).

Alguns monoterpenos foram anteriormente estudados em nosso laboratório quanto ao seu potencial embriofetotóxico em roedores, como por exemplo o beta-mirceno (Delgado et al., 1993), encontrado em uma variedade de plantas, incluindo o capim-limão, o lúpulo, a verbena e o louro; o citral (Nogueira et al., 1995) presente no limão, laranja, pomelo, tomates, trigo entre outros e o alfa-terpinene (Araújo et al., 1996) nas árvores de chá-australiana ('tea tree'). Os dados obtidos nesses estudos serão discutidos posteriormente nesta dissertação.

### **1.3 IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DOS ÓLEOS ESSENCIAS E SEUS CONSTITUINTES**

A beta-ionona é usada como intermediário na síntese industrial de fragrâncias e da vitamina A, além de funcionar também como aditivo alimentar, conferindo ou realçando o sabor e o aroma de alguns alimentos e bebidas (Ferreira, 2001).

Vários óleos essenciais são empregados hoje nas indústrias de cosméticos, de produtos domissanitários, de alimentos e farmacêutica. Diversos fármacos contendo óleos essenciais são comumente empregados pela população brasileira, entre eles sedativos, expectorantes, diuréticos, rubefacientes, anti-sépticos etc. Além de serem usados com fins terapêuticos, os óleos essenciais são empregados como substâncias mascaradoras do gosto desagradável de certos componentes ativos de medicamentos (Sticher, 1977).

Os constituintes de óleos essenciais são ainda comumente utilizados como aditivos alimentares. Tanto o sabor quanto o aroma são fatores que influem

consideravelmente a qualidade de um alimento, e podem repercutir diretamente no seu valor comercial. O sabor do morango, por exemplo, pode ser imitado por uma combinação entre uma série de substâncias, incluindo a beta-ionona, o álcool, o ácido acético, aldeídos, entre outros.

Apesar das técnicas de extração e destilação, utilizadas para o isolamento do material volátil das plantas, *i.e.* dos óleos essenciais, serem consideradas intervenções relativamente modernas, o uso de substâncias naturais provenientes diretamente das plantas, como as essências e as fragrâncias, é histórico. O uso do incenso e de fragrâncias pelos egípcios, no material utilizado no embalsamento de múmias, ilustra bem tal fato.

## **1.4 TOXICOLOGIA REPRODUTIVA**

### *1.4.1 HISTÓRIA DA TERATOLOGIA*

Teratologia (do grego ‘*teras*’ = monstro) é o estudo científico de anomalias congênitas (Persaud, 1979). Este termo é empregado para denominar alterações morfológicas ocorridas em um determinado período do desenvolvimento embrionário, *i.e.* durante a organogênese. A história da Teratologia, uma ciência essencialmente descritiva, nos remete a reflexões sobre as diversas religiões, crenças, visões e o grau de desenvolvimento tecnológico em diferentes civilizações ao longo dos tempos.

Desde os primórdios as malformações congênitas têm despertado a atenção do homem. O mais antigo registro associado a malformações humanas foi encontrado na Turquia, *i.e.* uma estatueta de mármore de 6500 AC (Figura 3), que retrata uma divindade dicefálica e foi citada por Josef Warkany em suas obras literárias dedicadas ao estudo da Teratologia Experimental (Warkany, 1977 ).

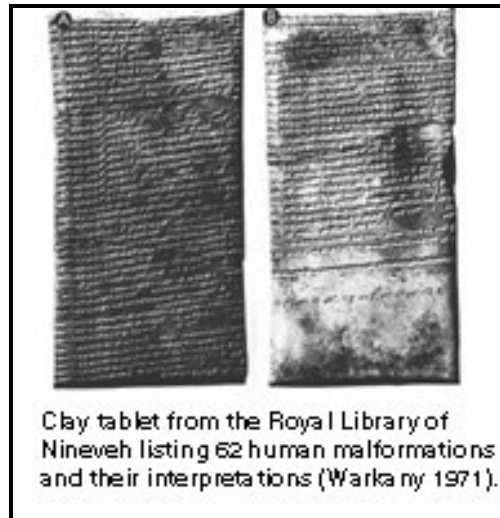


**Figura 3: Estatueta de mármore de 6500 AC.**

Na antiga Babilônia, na ausência de explicações científicas, o nascimento de crianças malformadas era atribuído a intervenções divinas ou diabólicas, podendo ser considerado também como evento premonitório de acontecimentos importantes. As Tábuas de Nineveh, escritas em argila há cerca de 4000 anos pelos caldeus e encontradas as margens do rio Tigre, registram cerca de 60 malformações e seus respectivos prognósticos (Figura 4). Constam destes registros, citações curiosas como previsões a respeito do futuro do rei, ou ainda, sobre a ocorrência de catástrofes naturais, guerras entre povos vizinhos, previsões de colheita, entre outros. Acontecimentos importantes eram associados ao nascimento de recém-natos com malformações específicas e estão bem documentadas nestes antigos registros (Persaud, 1979).

A busca por explicações que pudessem esclarecer o nascimento de crianças malformadas foi fato marcante ao longo do tempo e gerou o aparecimento de crenças, como, por exemplo, a das “impressões maternas” e dos “híbridos”. No caso das impressões maternas, acreditava-se que pensamentos e desejos dos pais durante a concepção e gravidez teriam reflexos na criança em desenvolvimento. Por exemplo, quando uma mulher olhasse firmemente para um homem forte e belo, seu filho nasceria com tais características. Na Grécia antiga, recomendava-se que as mães grávidas passassem parte da gestação a contemplar estátuas de poderosos

deuses, como Castor e Pollux, para que seus descendentes viessem ao mundo com características de beleza, força e inteligência. Acreditava-se que o nascimento de crianças sem estes atrativos se devia a inobservância destes conselhos por parte dos pais.



**Figura 4: Tábuas de Nineveh**

A hibridização, crença que parece ter surgido na Índia e no Egito, atribuía o nascimento de crianças com peculiaridades aberrantes e formas monstruosas, com características semelhantes às observadas em diferentes espécies animais, ao cruzamento entre homens e animais. O surgimento da teoria da hibridização pode ser explicado pela ocorrência de algumas malformações, tais como sindactilia, focomelia, ciclopia, ictiose, proboscitose etc, que conferem ao neonato aparência que causa estranheza aos olhos dos homens e que nos remete a comparações com as formas anatômicas de alguns animais (*e.g.* focomelia = foca, ictiose = peixes, proboscitose = mamíferos proboscídeos como a anta e o elefante etc).

Enquanto no antigo Egito o nascimento de “híbridos” era visto como intervenção divina, na Europa durante a Idade Média tal fato era associado à bruxaria e ao pecado e, em geral, mãe e filho eram condenados à morte.

Em 1523, Luther e Melanchthon escreveram o livro “*Der Papstesei*” (O asno do Papa) descrevendo o nascimento de uma criatura aberrante, encontrada às margens de um rio alemão. Luther e Melanchthon relacionaram o nascimento de tal criatura a um sinal divino que significaria o final do Papado (Persaud, 1979). Cerca de um século depois, Fortunius Licetus publicou o “*De Monstrorum*”, também conhecido como “*De Monstris*” (1616), que continha descrições de gêmeos acolados (xipófagos, craniópagos, isquiópagos etc), híbridos e monstros com diversas aberrações. Em “*De monstris*”, Licetus não teve limites e deu asas a sua imaginação fértil como pode ser visto nas ilustrações originais de seu livro (Figura 5).

Até mesmo o nascimento de animais domésticos com aberrações poderia levar à condenação de pessoas por prática de bruxaria ou proximidade ao demônio. Um caso espantoso, relatado em *New Haven, Connecticut* em 1641, retrata bem a crueldade da época e a intolerância a que eram submetidos aqueles que porventura se vissem envolvidos com o nascimento de neonatos malformados. O caso tem início com o nascimento de um leitão apresentando uma malformação conhecida como ciclopia (fusão dos globos oculares). O nascimento de tal animal chocou a população local, que logo saiu em busca de um possível “responsável” por tal acontecimento. Um sujeito de nome George Spencer foi considerado suspeito por duas razões, que na lógica daqueles tempos pareciam bastante razoáveis. Spencer, além de vizinho da fazenda onde o nascimento havia acontecido, tinha assim como o leitão um único olho saudável (o outro com catarata). E assim, em abril de 1642, tanto a mãe biológica do leitão como Spencer foram condenados à morte. Desfechos como este foram descritos por outros na Europa medieval.

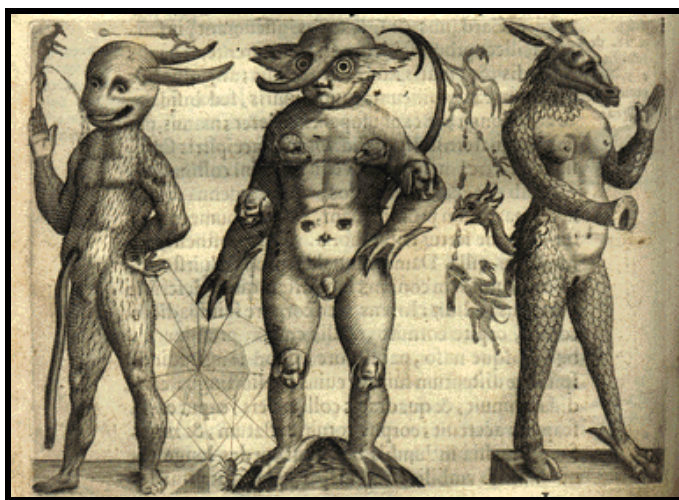


#### 1.4.2 BASES DA TOXICOLOGIA REPRODUTIVA MODERNA

Até a década de 1960 encontrava-se, com certa frequência, em revistas científicas especializadas no tema afirmações do tipo “Não há nenhuma evidência de que a ingestão de álcool por mulheres grávidas, mesmo que em quantidades irrestritas, cause qualquer efeito deletério sobre o feto” [...“*There is no evidence that alcoholic beverages ingested by the pregnant mother, even in immoderated amounts, has any deleterious effects upon the fetus*” por Ashley, 1962]. Hoje, os sintomas associados à Síndrome Fetal Alcoólica são tão bem conhecidos, que frases como as de Ashley causariam grande estranheza, mesmo para o público leigo.

Pode-se dizer que as investigações científicas sobre a origem de malformações congênitas em mamíferos, assim como os ensaios preditivos relacionados à Toxicologia do Desenvolvimento, são relativamente recentes. Vários fatores contribuíram para o atraso desta área da Toxicologia, sendo um deles relacionado à idéia preconcebida por parte da comunidade científica da época de que o desenvolvimento embrionário de mamíferos, por ocorrer no interior do útero materno, estaria protegido dos efeitos adversos de agentes ambientais. Acreditava-se que as conseqüências da exposição materna aos agentes ambientais poderiam ser, unicamente, do tipo “*tudo-ou-nada*”, ou seja, ou o agravo seria severo o suficiente para causar a morte do embrião e a interrupção da gravidez, ou então não causaria mal algum ao concepto (Manson, 1986).

Figura 5: Os Frutos da Hibridização segundo Fortunius Licetus.



Ilustrações do “*De Monstris*”, de 1616

A partir da década de 1930, começaram a surgir as primeiras constatações experimentais de que o organismo materno não era tão eficiente como se julgava em proteger o embrião contra efeitos adversos induzidos por fatores ambientais. Hale (1935) constatou o aparecimento de malformações (*e.g.* anoftalmia e fenda palatina) em porcos nascidos de mães com uma dieta deficiente em vitamina A. Mais tarde, tanto a hipo- quanto a hipervitaminose A foram associadas ao aparecimento de malformações também em roedores (Warkany & Nelson 1941). Seguindo esta mesma linha de raciocínio, várias investigações foram realizadas e acabaram por fortalecer a idéia de que fatores ambientais externos estariam envolvidos com o aparecimento de malformações congênitas. Neste contexto, demonstrou-se experimentalmente que exposições *in utero* a xenobióticos e agentes físicos, tais como a radiação ionizante (raios X), os anti-neoplásicos, o azul de tripan e uma variedade de outros agentes, eram capazes de induzir malformações em embriões de mamíferos (Manson, 1986).

Todos estes estudos evidenciavam que fatores ambientais poderiam afetar adversamente o desenvolvimento embrionário mas, ainda assim, persistia a crença de que no homem os mecanismos hereditários seriam a única explicação satisfatória para a ocorrência de defeitos ao nascimento. Os resultados obtidos por Hale (1935) e por outros autores de sua época eram tidos como conseqüências excepcionais de manipulações experimentais em laboratório e, portanto, não extrapoláveis para a gênese de malformações humanas. Foram, entretanto, observações clínicas que despertaram a atenção da comunidade científica para a importância de fatores ambientais como agentes etiológicos de malformações em seres humanos.

#### 1.4.2.1 TERATÓGENOS HUMANOS

Gregg, em 1941 já havia identificado o vírus da rubéola como o primeiro agente ambiental responsável por causar malformações humanas. A infecção de mulheres grávidas pelo vírus da rubéola levava ao nascimento de crianças com uma síndrome que incluía malformações oculares, cardiovasculares, surdez e retardo mental. As constatações foram feitas durante uma epidemia de rubéola quando se estabeleceu também a relação entre o período de gestação em que ocorria a exposição ao vírus e o tipo de malformação que ele produzia. Uma epidemia ocorrida nos Estados Unidos, anos depois, levou ao nascimento de mais de 20.000 crianças com anomalias congênitas.

Ainda entre as década de 1950 e 1960, observou-se nova tragédia humana em consequência da exposição pré-natal a fatores ambientais; desta vez na baía de Minamata, Japão. Um aumento inusitado na incidência de nascimentos de crianças com distúrbios neurológicos graves, *i.e.* crianças diplégicas, tetraplégicas, portadoras de retardo mental, de incoordenação motora e de distúrbios de equilíbrio, com incapacidade de sustentação do corpo e outras sintomas, coincidiu com o aparecimento de alterações neurológicas em gatos e na população adulta local. Em alguns povoados da baía de Minamata, cerca de 12% dos recém nascidos foram afetados. Em 1962 foi estabelecida a associação entre o nascimento de crianças com tais seqüelas irreversíveis e a contaminação da baía por metilmercúrio, contido nos resíduos produzidos pela indústria química *Chisso*, que fabricava acetaldeído usado na produção de material plástico e despejava seus rejeitos no mar.

O envenenamento por mercúrio não era novidade<sup>1</sup>, mas mesmo assim foi necessário mais de uma década de exposição até que fosse estabelecida a relação causal entre a contaminação da baía e o aparecimento dos sintomas da hoje conhecida Doença Fetal de Minamata. A situação dramática que afetou o Japão serviu como mais um alerta sobre os riscos da exposição ambiental a metais pesados, e também demonstrou que o organismo em desenvolvimento não estava totalmente protegido no interior do útero materno. Pelo contrário, hoje se sabe que o metilmercúrio atravessa a barreira placentária e causa seqüelas irreversíveis no feto que é cerca de 10 vezes mais sensível aos seus efeitos adversos do que o organismo adulto.

Apesar dos acontecimentos descritos acima e seus desfechos trágicos, até meados da década de 1960, não haviam sido estabelecidas medidas suficientemente rigorosas para proteger o embrião e o organismo materno dos agentes ambientais. Evidência nesse sentido é a descoberta do efeito teratogênico da talidomida no início dos anos 1960. No final da década de 1950, notou-se o nascimento freqüente de crianças com um tipo até então raro de malformação caracterizada por encurtamento pré-axial (focomelia) e ausência total dos membros (amelia). Este episódio ficou conhecido como *Tragédia da Talidomida*. A Talidomida (Contergan®) foi desenvolvida pela indústria alemã *Chemie Grünenthal*, sendo introduzida no mercado em meados dos anos de 1950, como um medicamento “seguro” com propriedades sedativas/hipnóticas. Após ter sido caracterizada como teratogênica, a talidomida foi retirada do mercado em 1961, deixando cerca de 10.000 vítimas em diferentes países.

---

<sup>1</sup> O chapeleiro louco de "*Alice no País das Maravilhas*", por exemplo, vem da expressão "louco como um chapeleiro", que surgiu porque o mercúrio usado para preparar o feltro utilizado para confecção dos chapéus era a causa comum de envenenamento que costumava atingir os chapeleiros que, uma vez intoxicados, exibiam o mesmo comportamento que os indivíduos afetados em Minamata.

Desde então, novos fármacos teratogênicos foram identificados, como derivados cumarínicos (varfarina), vitamina A e seus derivados, antifolatos ou anticonvulsivantes, como a hidantoína e ácido valpórico. (Paulus, 1999). No entanto, os acontecimentos descritos anteriormente e outros como, por exemplo, a carcinogenicidade transplacentária induzida pelo dietilestilbestrol, derrubaram definitivamente o dogma da invulnerabilidade do embrião de mamíferos a agravos ambientais, e marcaram início de uma preocupação maior com a prevenção dos defeitos congênitos através da identificação de potenciais teratógenos.

Pode-se dizer que a inquietude quanto à inocuidade de xenobióticos recomendados a mulheres grávidas é cada vez mais evidente a partir da “Tragédia da Talidomida”, e este fato provocou um grande impacto na área regulatória, fazendo com que a avaliação pré-clínica e clínica de segurança e eficácia dos medicamentos se tornasse mais rigorosa e se estendesse a outros produtos, como pesticidas, aditivos alimentares e substâncias químicas em geral. Este rigor fez com que as autoridades sanitárias de diversos países elaborassem diretrizes sobre a condução de estudos pré-clínicos e clínicos de segurança e eficácia.

#### *1.4.3 DIRETRIZES DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA*

Os estudos pré-clínicos de toxicidade reprodutiva consistem em ensaios realizados em animais, a fim de verificar o potencial de uma substância química nova em provocar efeitos adversos sobre o processo reprodutivo, incluindo a fertilidade, o acasalamento, o desenvolvimento embriofetal, o parto, e o desenvolvimento pós-natal dos descendentes até a maturidade reprodutiva. É uma das áreas mais complexas da Toxicologia Preditiva, porque o ciclo reprodutivo prolonga-se por grande parte da vida do indivíduo, iniciando-se com a produção dos gametas nos pais (ainda no período pré-natal), seguindo pela fertilização e desenvolvimento embriofetal, nascimento e desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual quando os descendentes, já adultos, tornam-se capazes de procriar.

As diretrizes, embora não possuam força de lei, traduzem as expectativas das agências regulatórias e por isto são seguidas à risca pelas indústrias. As diretrizes da agência americana de controle de medicamentos FDA (US Food and Drug Administration), e da União Européia, EEC (European Economic Community) recomendam a realização de abrangentes estudos de toxicidade reprodutiva em três segmentos, como segue:

**Segmento I** - Visa a avaliação de efeitos adversos sobre a fertilidade e o desempenho reprodutivo geral. Os animais são expostos pela via preconizada para o uso em humanos, e pelo menos três níveis de doses são testados. Para que haja uma exposição suficiente incluindo todo o período da espermatogênese e ovogênese, os machos são tratados por 90 dias antes do cruzamento e as fêmeas por 21 dias antes do acasalamento. Após o cruzamento os machos são sacrificados e necropsiados, sendo realizada uma análise meticulosa dos órgãos reprodutivos, incluindo histopatologia de testículos. As fêmeas permanecem em tratamento durante toda a gravidez. Ao fim da gestação, metade das fêmeas é submetida à cesareana e o restante prossegue para o parto espontâneo, e continua a ser tratada durante o período de lactação até o desmame da prole (21º dia de vida pós-natal). Os desfechos analisados neste segmento são: fertilidade, frequência de malformações de vísceras e esqueletos de fetos obtidos por cesárea e o desenvolvimento pós-natal da prole exposta.

**Segmento II** – Visa a avaliação da teratogenicidade ou embriofeto-toxicidade. O tratamento é realizado no período da organogênese que, no rato, vai do 6º ao 15º dia de gestação. No 21º dia de gestação é realizada a cesárea, os fetos são analisados quanto à presença de malformações externas. Após, 1/3 de cada ninhada é fixado, para análise de malformações viscerais e 2/3 são diafanizados e corados com Alizarina Red S para análise de malformações esqueléticas. Neste segmento, os experimentos são realizados com uma espécie de roedor, em geral ratos ou camundongos, e um não-roedor, em geral o coelho.

**Segmento III** - Investiga os efeitos adversos sobre o desenvolvimento perinatal, parto e pós-natal da prole. No rato o tratamento tem início no 15º dia de gestação, prossegue durante o parto e continua até o desmame da prole (por volta do 21º dia de vida pós-natal). São analisados os seguintes desfechos: problemas durante o parto, a sobrevivência no período neonatal e o desenvolvimento somático e neurocomportamental durante o período pós-natal. Recomenda-se também avaliar a fertilidade da prole exposta *in utero* quando esta atinge a maturidade sexual. Neste segmento uma espécie de roedor é considerada suficiente.

Nos últimos anos, a fim de harmonizar suas propostas em diretrizes únicas, países inseridos na Comunidade Econômica Européia, os Estados Unidos e o Japão criaram o ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), que é um Fórum Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano. Deste Fórum surgiram as Diretrizes Harmonizadas Tripartite.

Simultaneamente a criação das diretrizes harmonizadas, observou-se por parte da comunidade científica e órgãos regulatórios uma maior preocupação com possíveis seqüelas funcionais induzidas *in utero*. Neste contexto, a avaliação de toxicidade funcional, que em geral inclui a avaliação de possíveis efeitos sobre o desenvolvimento neurocomportamental e da função reprodutiva, é recomendada nas ICHs, como pode ser observado no Quadro 1. Tais avaliações incluem: atividade locomotora, teste de memória, desenvolvimento de reflexos, maturação do tempo sexual, acasalamento e fertilidade (“Reviewer Guidance” - FDA, 2001).

O Brasil não participa ativamente deste Fórum, podendo ser considerado apenas como país observador, *i.e.* que procura seguir as recomendações contidas nas diretrizes ICH, sobretudo nos casos em que não possui regulamentação própria. De um modo geral, estudos de medicamentos novos dificilmente são de iniciativa



da indústria brasileira e as multinacionais já adotam as diretrizes da ICH, portanto, é plausível uma regulamentação nacional tendo-as por fundamento.

**Quadro 1:** Resumo dos protocolos de estudos *in vivo* para avaliação não-clínica da toxicidade reprodutiva.

ESTUDO	EXPOSIÇÃO	DESFECHOS REGISTRADOS	COMENTÁRIOS
<b>Segmento 1</b> Fertilidade e Desempenho reprodutivo	Machos: 10 semanas antes do acasalamento Fêmeas: 2 semanas antes do acasalamento	Desenvolvimento do gameta, fertilidade, viabilidade pré-e pós-implantação, nascimento e lactação.	Avalia a capacidade reprodutiva de machos e fêmeas após exposição por todo o ciclo espermatogênico e oogênico
<b>Segmento 2</b> Embriofetotoxicidade	Da implantação ao final da organogênese	Viabilidade e morfologia (análise externa, visceral e esquelética) do concepto antes do nascimento.	Exposição curta para prevenir adaptação do metabolismo materno e fornece alta exposição ao embrião durante período de vulnerabilidade associado à gastrulação e organogênese
<b>Segmento 3</b> Desenvolvimento peri e pós-natal	Do último trimestre da gestação até a lactação	Sobrevivência pós-natal, crescimento e morfologias externas	Observa os efeitos sobre o desenvolvimento dos principais órgãos funcionais durante o período peri-natal
<b>ICH 4.1.1</b> Protocolo de fertilidade	Machos: 4 semanas antes do acasalamento Fêmeas: 2 semanas antes do acasalamento	Machos: peso e histologia dos órgãos reprodutivos, motilidade e contagem dos espermatozoides. Fêmeas: viabilidade do concepto na metade da gravidez ou mais tarde	Avaliação dos desfechos reprodutivos dos machos; duração do tratamento é menor do que no <i>Segmento 1</i>
<b>ICH 4.1.2</b> Efeitos sobre o desenvolvimento pré-natal e pós-natal, incluindo funções maternas.	Da Implantação ao final da lactação	Toxicidade relativa de fêmeas grávidas vs não grávidas; viabilidade pós-natal, crescimento, desenvolvimento, e déficits funcionais (incluindo comportamento, maturação e reprodução).	Semelhante ao estudo de <i>Segmento 1</i>
<b>ICH 4.1.3</b> Efeitos sobre o desenvolvimento embriofetal	Da Implantação ao final da organogênese	Viabilidade e morfologia dos fetos (análise externa, visceral e esquelética) antes do nascimento.	Semelhante ao estudo de <i>Segmento 2</i> , usualmente conduzido em duas espécies (roedor e não-roedor).
<b>OECD 414</b> Estudo da toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal	Da Implantação (ou acasalamento) até um dia antes da cesárea	Viabilidade e morfologia dos fetos (análise externa, visceral e esquelética) antes do nascimento.	Semelhante ao estudo de <i>Segmento 2</i> , usualmente conduzido em duas espécies (roedor e não-roedor).

Fonte: Rogers & Kavlock, 2001.

## 2. OBJETIVO

---

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial embriotóxico da beta-ionona em ratos, investigando mais especificamente os seguintes efeitos induzidos *in utero* por este composto:

1. embriofetalidade,
2. retardo do crescimento intra-uterino,
3. aparecimento de malformações viscerais e esqueléticas (*i.e* efeito teratogênico), e
4. determinar o *NOAEL* - dose máxima de dose em que não são observados efeitos adversos - para a toxicidade pré-natal da beta-ionona.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

Este estudo foi realizado segundo os Procedimentos Operacionais Padrão (P.O.P.) do Laboratório de Toxicologia Ambiental para as seguintes etapas do experimento: acasalamento, confirmação da cópula e do dia zero de gestação, tratamento dos animais, cesárea, avaliação de malformações esqueléticas e viscerais e análise estatística dos resultados.

#### 3.1 TESTE PILOTO

Para estabelecer as doses a serem empregadas no experimento, foi necessário realizar um teste piloto, com quatro níveis de dose, além do grupo controle, como sugerido pelas diretrizes internacionais. As diretrizes preconizam também que o limite superior do intervalo de doses seja suficientemente alto para produzir alguma toxicidade materna (não mais que 10% de mortalidade) ou toxicidade para o embrião, e o limite inferior deste intervalo seja uma dose próxima da dose terapêutica e que não cause efeitos embriotóxicos (Collins *et al*, 1999). Este procedimento permite a fixação do NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*, ou o nível máximo de dose em que não se observa efeito adverso) com maior precisão.

O teste piloto seguiu o mesmo desenho de um estudo de Toxicidade Reprodutiva de Segmento II, diferindo apenas no número de animais usados. Para a realização do piloto foram utilizados 5 grupos (N = 5 animais/grupo) a saber:

- Grupo Controle: recebeu apenas o veículo (óleo de milho), e
- Grupos Tratados: receberam beta-ionona nas doses de 1000, 500, 250 e 125 mg/kg de peso corporal diluída em óleo de milho.

A metodologia descrita a seguir foi usada tanto no teste piloto como no experimento propriamente dito.

### **3.2 ANIMAIS**

Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas nulíparas e machos, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL-FIOCRUZ), pesando aproximadamente 200g e com aproximadamente 60 dias de vida.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais retangulares de fundo sólido e de plástico, com cama de maravalha de pinho branco, fechadas com tampas de aço inoxidável de modo a permitir a acomodação da ração paletizada e do frasco bebedouro. Os animais receberam ração comercial para ratos e camundongos (Nuvital®, Nuvilab Ltd, Curitiba, PR, Brasil) e água *ad libitum* e foram mantidos em condições ambientais controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa do ar (ca. de 70%) e ciclo claro-escuro constante (12 horas cada).

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ), de acordo com o protocolo P0018-00.

### **3.3 ACASALAMENTO**

O acasalamento dos animais foi realizado segundo o procedimento proposto por Chahoud & Kwasigroch (1977). Após o período de aclimação, *i.e.* uma semana após a chegada dos animais ao biotério, duas fêmeas foram transferidas para a gaiola de um macho durante as duas últimas horas do período escuro (de 06:00 às 08:00 horas da manhã). A ocorrência do cruzamento foi confirmada pela presença

do "plug" (massa esbranquiçada de espermatozóides na abertura vaginal) ou pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal.

Para preparar o esfregaço vaginal o material é coletado do canal vaginal, com o auxílio de hastes flexíveis de algodão embebidas em água destilada, repassado para uma lâmina e posteriormente examinado ao microscópio ótico quanto a presença de espermatozóides. Este procedimento foi realizado somente nas fêmeas que não apresentavam "plug" vaginal.

As primeiras 24 horas após a confirmação do acasalamento foram consideradas como sendo o dia zero (D0) de gestação.

### 3.4 TRATAMENTO

Após confirmação do acasalamento, as fêmeas foram alojadas em gaiolas individuais e distribuídas em 5 grupos experimentais de aproximadamente 15 animais cada. A beta-ionona (Sigma®, Beta-Ionone - (4-[2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl]-3-buten-2-one),  $C_{13}H_{20}O$  - CAS 79-77-6) foi diluída em óleo de milho (Mazola®) e administrada por entubação gástrica, com auxílio de uma sonda (Complast®, sonda uretral nº6, com 1 furo), do dia 6 ao dia 15 de gestação, em doses diárias de 1000, 500, 250 e 125 mg beta-ionona/kg de peso corporal. O grupo controle recebeu apenas o veículo (óleo de milho).

As soluções foram preparadas de modo a se administrar um volume correspondente a 5ml/kg de peso corpóreo; sendo feitas a cada dois dias, armazenadas em recipientes isolados de luz e fechados com *Parafilm®* e armazenadas em geladeira. As soluções de beta-ionona foram administradas à temperatura ambiente, sempre na parte da manhã, entre 8:00 e 12:00 horas.

As fêmeas foram pesadas no dia zero, diariamente durante todo o período de tratamento (diariamente, do dia 6 ao dia 15) e no dia 21 dia de gestação. No período do tratamento, as fêmeas examinadas diariamente quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade.

Para o registro dos sinais de toxicidade foi utilizado um protocolo de análise de sinais clínicos, contemplando os seguintes itens: estresse; hipoatividade; respiração acelerada; irritação; tremores musculares; hipotonia; prostração; piloereção; paralisia posterior; cromodacriorréia; convulsões; respiração abdominal; epistaxis; vocalização; salivação; lacrimejamento; diarreia; resposta a estímulo exterior e perda de pêlo. Qualquer manifestação anormal e diferente das contidas no protocolo foram registradas adicionalmente.

### **3.5 CESARIANA**

Todas as fêmeas foram sacrificadas<sup>2</sup> no dia 21 de gestação por inalação forçada de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e logo após foi iniciada a cesariana.

Durante a cesárea, o útero e os ovários de cada fêmea foram expostos, mantendo-se a posição original (direito e esquerdo). O número de fetos vivos e mortos, de sítios de implantação, de reabsorções e corpos lúteos gravídicos foi registrado. Após a abertura do útero, os fetos foram retirados, um a um, e cada um deles sofreu uma meticulosa análise no sentido crânio-caudal, na tentativa de se encontrar malformações visíveis externamente. Foram considerados fetos vivos aqueles que apresentaram movimentos das patas traseiras após estímulos mecânicos e sinais respiratórios.

---

<sup>2</sup> O procedimento de eutanásia que antecedeu a cesariana foi realizado como recomendado pelas normas de ética em experimentação animal adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A ação do CO<sub>2</sub> é rápida e tem efeito letal por provocar depressão do sistema nervoso central (Andrade, 2002).

Os fetos mortos foram identificados pela ausência de sinais respiratórios e pela presença de cianose na face ou extremidades. Em seguida, todos os fetos vivos foram pesados, numerados com caneta para marcação permanente e distribuídos aleatoriamente para análise de esqueleto (2/3 dos fetos de cada ninhada, fixados em formol a 5%) e análise visceral (1/3 dos fetos de cada ninhada, fixados em solução de *Bouin*).

Os sítios de implantação foram identificados pelo método descrito por Salewski (Salewski, 1964), nos úteros livres de seu conteúdo. O útero foi imerso em solução de sulfeto de amônio a 10%, por 10 minutos. Em seguida, o útero foi lavado em água corrente e mergulhado por mais 10 minutos em uma solução formada por partes iguais de ferrocianeto de potássio a 20% e ácido clorídrico a 1%. Os sítios de implantação que aparecem como pontos escuros foram localizados e contabilizados.

O número de reabsorções totais (tardias, intermediárias e precoces) é resultado do número de sítios de implantações menos o número de fetos vivos. As reabsorções tardias e intermediárias podem ser detectadas a olho nu, enquanto que as reabsorções precoces só são identificadas pelo método de Salewski.

Com o auxílio de duas pinças curvas, os ovários de cada fêmea foram abertos. Os corpos lúteos gravídicos foram contados, após a retirada dos ovários direito e esquerdo. Considerou-se como corpos lúteos gravídicos aqueles grandes e amarelados, e, não-gravídicos, os pequenos, numerosos e avermelhados.

### **3.6 ANÁLISE VISCERAL**

A análise visceral foi realizada em 1/3 dos fetos de cada ninhada fixados em solução de *Bouin*, como descrito na técnica adaptada por Masson (Langeron, 1934). A análise de anomalias viscerais pela técnica de microdissecação compreendeu a avaliação da posição, tamanho, forma e peso de órgãos como fígado, baço, coração, pulmão, timo, rins e outros (Sterz, 1977).



Para este procedimento, o feto foi colocado em uma base de borracha ou cortiça e fixado com o auxílio de duas agulhas pela pele lateral do pescoço e observado em estereomicroscópio (Olympus SZX12, Olympus Optical co LTD®).

Com auxílio de um bisturi (Lâmina Cirúrgica Med Blade® n.º 24), fez-se um corte de forma triangular na região abdominal de cada feto e com o auxílio de uma pinça retirou-se a pele. A partir desta abertura, as vísceras da cavidade abdominal (rins, fígado e baço) foram observadas quanto à posição, retiradas, pesadas e analisadas. Após, observou-se o diafragma – se intacto ou não. Em seguida, foram feitos dois cortes laterais ao esterno, que possibilitaram a observação quanto à posição, forma e tamanho das vísceras da cavidade torácica (pulmões, coração e timo). O palato foi analisado quanto à presença de fendas ou irregularidades. Sobre a cabeça foram realizados cortes longitudinais, um anterior ao lóbulo da orelha e outro posterior, onde foi possível visualizar os ventrículos laterais, terceiro e quarto, que foram analisados quanto à presença de dilatação ou forma irregular. O sexo foi determinado pela observação da distância ano-genital, sendo confirmado pela presença de testículos ou útero.

Todos os dados foram registrados em protocolo próprio para a análise visceral. Além dos órgãos supracitados que foram retirados, pesados e analisados, outras estruturas e órgãos, como *e.g.* genitais (testículos e útero), supra-renais, ureteres, estômago, aurículas e traquéia, foram igualmente examinados.

### **3.7 ANÁLISE ESQUELÉTICA**

A análise esquelética foi realizada em 2/3 dos fetos de cada ninhada fixados em formol a 5%, que foram clareados com hidróxido de potássio a 10% e corados com *Alizarin Red S* (Dawson, 1926), como descrito a seguir:

Os fetos foram eviscerados (processo de retirada das vísceras) cuidadosamente para não danificar o esqueleto, repassados para uma cuba apropriada e colocados em solução de éter etílico e etanol absoluto. Os fetos

permaneceram por uma semana nesta solução e em seguida foram lavados em água. Para coloração do esqueleto e clareamento da pele, os fetos ficaram numa solução com *Alizarin Red. S* a 0,3% e Hidróxido de Potássio (KOH a 10%), por aproximadamente oito dias, sendo realizadas trocas a cada dois dias. Permaneceram por mais dois dias em uma solução similar a anterior, porém reduzida, contendo água destilada, KOH a 10% e *Alizarin Red S* a 0,3%. Após, foram lavados em água, e repassados para uma solução de álcool benzílico, etanol e glicerol, onde foram mantidos por 24 horas. Terminado o processo de coloração, os fetos foram colocados em glicerina para posterior análise.

Na análise de esqueleto, os ossos foram avaliados no sentido crânio-caudal em estereomicroscópio (Olympus SZX12, Olympus Optical co LTD®), quanto à posição, forma (malformação óssea) e problemas de calcificação óssea (retardo ósseo), onde as anomalias encontradas foram classificadas segundo Wise e colaboradores (Wise et al., 1997) e registradas em protocolo apropriado.

### **3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise de variância (ANOVA) foi usada para tratamento dos dados que se ajustavam a uma curva normal. O teste de *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Mann-Whitney* foi usado para a análise de dados não-paramétricos. Para a análise de proporções e percentagens, utilizou-se o teste do Qui-quadrado. Em todos os casos as diferenças foram considerados estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ . Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa MINITAB® (MTB, University of Pennsylvania, 1984).

### 3.9 REAGENTES

Os seguintes reagentes foram utilizados neste estudo:

1) Beta-Ionona

Pureza: 97,3%

Lote: AARA 00192

2) Óleo de milho Mazola®

Procedência: Refinações de milho Brasil, Brasil.

3) Ácido clorídrico fumegante - HCl

Lote: 1216036003

Merck

4) Ferrocianeto de potássio

Lote: A813384510

Merck

5) Sulfeto de amônio

Lote: 737U617242

Vetec Química Fina Ltda.

6) Formaldeído, P.A.

Lote: 011656

ISO FAR

7) Álcool benzílico

Lote: 931521

Vetec Química Fina Ltda.

8) Álcool etílico

Lote: 007029

Merck

9) Alizarin Red S

Lote: 121K2503

Sigma – Aldrich

10) Glicerina

Lote: 941452

Vetec Química Fina Ltda.

11) Hidróxido de potássio

Lote: 921575

Vetec Química Fina Ltda.

12) Éter dietílico

Lote: K31196021

Merck

### **3.10 PREPARO DE SOLUÇÕES**

- Solução de Bouin

Formaldeído 100 ml

Água destilada 300 ml

Ácido acético glacial 20 ml

Ácido pícrico à saturação

- Formol 5% em água destilada

## 4. RESULTADOS

---

### 4.1 TOXICIDADE MATERNA

A observação dos animais e os dados apresentados na Tabela 1 indicaram que beta-ionona, na dose de 1000mg/kg de peso corpóreo/dia, causou discreta toxicidade materna, evidenciada tanto pela redução do ganho de peso das mães durante o período de tratamento, como pelo surgimento de alterações clínicas comportamentais.

**Tabela 1:** Ganho de peso materno de ratas tratadas com beta-ionona (0, 125, 250, 500 e 1000 mg/kg de peso corporal/ dia) do dia 6 ao 15 de gestação.

Tratamento	Beta-ionona (mg/kg de peso corporal/dia)				
	0	125	250	500	1000
Fêmeas Tratadas (N)	17	17	18	18	20
Fêmeas Grávidas (N)	16	16	15	17	12
Fêmeas Tratadas/Grávidas (%)	94	94	83	94	60 <sup>a,b,c</sup>
<b>Peso Materno (g)</b>					
Dia 0	208,0 ± 17,8	208,7 ± 12,2	207,9 ± 17,9	201,6 ± 17,4	212,5 ± 16,9
Dia 21	329,9 ± 25,6	336,8 ± 22,6	331,7 ± 40,3	331,8 ± 30,2	321,5 ± 36,3
<b>Peso do Útero Gravídico (g)</b>	71,6 ± 13,7	75,9 ± 16,2	72,6 ± 23,1	76,8 ± 15,6	68,2 ± 23,6
<b>Ganho de Peso Materno (g)</b>					
Dia 0 – 6	21,5 ± 9,0	30,1 ± 7,8	28,9 ± 8,8	26,0 ± 18,6	25,5 ± 8,7
Dia 6 – 11	13,2 ± 14,6	18,3 ± 12,0	13,2 ± 11,5	16,0 ± 15,2	4,5 ± 8,2 <sup>a,b,c,d</sup>
Dia 6 – 15	35,8 ± 11,2	32,7 ± 15,9	31,8 ± 8,9	34,9 ± 13,2	21,2 ± 13,6 <sup>a,b,c,d</sup>
Dia 15 – 21	64,7 ± 10,5	65,3 ± 19,0	63,1 ± 27,8	69,3 ± 13,8	62,3 ± 24,3
Dia 0 – 21	121,9 ± 14,4	128,1 ± 22,0	123,8 ± 34,4	130,2 ± 25,6	109,0 ± 32,9
Dia 0 – 21 (menos o peso do útero)	50,3 ± 11,0	52,2 ± 13,9	51,2 ± 17,0	53,4 ± 18,8	40,8 ± 11,9

Os dados são mostrados como média ± desvio padrão. Os pesos maternos no dia 0 e no dia 21, assim como o peso do útero gravídico, foram analisados pela análise de variância de um critério (one-way ANOVA). Os valores relativos foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney ou, no caso do percentual de fêmeas tratadas/grávidas, pelo teste do Qui-quadrado. Em todos as análises, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$ . As diferenças são indicadas como se segue: a ≠ controle, b ≠ 125mg beta-ionona/kg, c ≠ 250mg beta-ionona/kg, e d ≠ 500mg beta-ionona/kg.

A Tabela 1 mostra a evolução ponderal das fêmeas tratadas com beta-ionona durante a gestação. Logo nos primeiros dias de tratamento, *i.e.* entre os dias de 6 e 11 de gestação, o ganho de peso das fêmeas tratadas com a maior dose de beta-ionona ( $4,5 \pm 8,2$  g) foi cerca de 3 vezes menor ( $p=0,0248$ ) que aquele observado no grupo controle ( $13,2 \pm 14,6$  g). Esta redução permaneceu evidente durante todo o tratamento (peso do dia 15 *menos* peso do dia 6,  $p=0,0066$ ). No entanto, ao término do período de tratamento, observa-se a recuperação das fêmeas do grupo de 1000mg/kg de peso corpóreo/dia e, ao final da gestação, não há mais diferença estatística entre o peso médio das fêmeas tratadas com beta-ionona ( $321,5 \pm 36,3$  g) e o grupo controle ( $329,9 \pm 25,6$  g).

A toxicidade materna pode ser percebida também pelo aparecimento de sinais de toxicidade (Tabela 2), tais como piloereção, vocalização e cromodaciorréia, observados durante a gestação, exclusivamente nos grupos tratados com as maiores doses de beta-ionona. Estes sinais foram observados a partir do dia 7 de gestação nos animais tratados com a dose de 1000mg beta-ionona/kg de peso corporal/dia, e a partir do dia 13, com frequência menor, nos animais expostos a 500mg beta-ionona/kg de peso corporal/dia.



**Tabela 2:** Sinais de toxicidade notados nas fêmeas tratadas com beta-ionona .

	<b>Beta-ionona (mg/kg de peso corporal/dia)</b>				
	<b>0</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
<b>N<sub>o</sub> de fêmeas tratadas</b>	17	17	18	18	20
<b>N<sub>o</sub> de fêmeas grávidas</b>	16	16	15	17	12
<b>N<sub>o</sub> de fêmeas com sinais de toxicidade:</b>					
Piloereção	0	0	0	0	10/6
Vocalização	0	0	0	0	4/2
Hiperatividade	0	0	0	0	1/1
Cromodacriorréia	0	0	0	4/4	7/3
Epistaxis	0	0	0	0	0
Hipoatividade	0	0	0	1/1	1/0
Lacrimejamento	0	0	0	0	1/1
Queda de pêlos	0	0	0	0	1/1
Letargia *	0	0	0	0	1/1

N<sub>o</sub> de fêmeas tratadas com sinais de toxicidade/N<sub>o</sub> de fêmeas grávidas com sinais de toxicidade.

\*Letargia: medida através da resposta a estímulo externo.

## 4.2 EMBRIOTOXICIDADE

### 4.2.1 EMBRIOLETALIDADE

O número médio de corpos lúteos gravídicos por ninhada não diferiu entre os grupos experimentais (Tabela 3). A ausência de alterações desta variável é um resultado até certo ponto previsível, porque o tratamento com beta-ionona teve início 6 dias após o fecundação.

Já na análise da razão entre fêmeas tratadas e fêmeas grávidas, observou-se uma redução significativa na dose de 1000mg de beta-ionona/kg de peso corpóreo/dia, como pode ser visto na Tabela 1. Enquanto no grupo controle, 94% das fêmeas tratadas entre os dia 6 e dia 15 de gestação, foram consideradas “grávidas” (*i.e.* comprovação da gestação através da presença de fetos ou, na ausência de fetos, pela detecção de pontos de implantação pelo método de Salewski no dia da cesárea), no grupo que recebeu a maior dose de beta-ionona, este percentual foi de apenas 60%. A explicação mais plausível para este achado, é a possibilidade de ter havido perdas muito precoces, ocorridas no momento da implantação ou logo após esta ter tido início<sup>3</sup> e que coincidiram com o início do tratamento com beta-ionona (dia 6 de gestação). Como estas perdas ocorreram no momento inicial da implantação, elas fogem à regra de detecção das demais reabsorções, que são *a priori* detectadas a olho nu (no caso das reabsorções tardias e intermediárias) e/ou pelo método de Salewski (no caso das reabsorções precoces em que há sítio de implantação mas não há sinal de feto vivo ou morto). Sendo assim, este resultado sugere o aumento de perdas pré- e/ou peri-implantação, *i.e.* causadas por volta do dia 6 de gestação, logo no primeiro momento do tratamento com beta-ionona.

---

<sup>3</sup> Segundo Leone (1977), a implantação do blastocisto no útero da rata ocorre, aproximadamente, 6 dias após a fertilização e ainda está em curso ente os dias 6 e 8 de gravidez.

Como não observamos diferença quer do número médio de implantações por ninhada, quer do número médio de fetos vivos por ninhada, entre o grupo controle e os demais grupos experimentais (Tabela 3), pode-se dizer que as perdas pré-/peri-implantação induzidas pela beta-ionona tenderam a um efeito do tipo “*tudo-ou-nada*”, *i.e.* em ninhadas mais suscetíveis a beta-ionona levou à morte de toda a prole, porém no caso das 12 ninhadas remanescentes pertencentes ao grupo de 1000mg/kg peso corpóreo, não se observou aumento do número médio de reabsorções por ninhada (controle:  $1,00 \pm 0,82$  *versus* beta-ionona:  $2,08 \pm 3,29$ ).

No entanto, vale ressaltar que apesar da exposição pré-natal à beta-ionona não ter induzido redução do número médio de fetos vivos por ninhada (controle:  $10,8 \pm 2,4$  *versus* beta-ionona:  $10,0 \pm 3,4$ ), quando analisamos o valor percentual de reabsorções em relação ao número de implantações [reabsorções/implantação (%)], encontramos para o grupo tratado com a maior dose de beta-ionona (17,2%) um valor cerca de duas vezes maior do que aquele observado no grupo controle (8,4%) – (Tabela 3).

Podemos dizer, portanto, que tanto a diminuição na proporção de fêmeas tratadas/grávidas, quanto o aumento da proporção de reabsorções por implantações indicaram que o tratamento com beta-ionona durante a gestação causou morte embrionária a partir da dose de 1000 mg de beta-ionona/kg de peso corpóreo/dia.

**Tabela 3:** Parâmetros avaliados durante a cesariana de ratas tratadas com beta-ionona (0, 125, 250, 500 e 1000 mg/kg de peso corporal/ dia) do dia 6 ao dia 15 de gestação.

Tratamento	Beta-ionona (mg/kg de peso corporal/dia)				
	0	125	250	500	1000
<b>N° de Ninhadas</b>	16	16	14 <sup>Ψ</sup>	17	12
<b>N° Total de Fetos</b>	173	182	160	191	120
<b>Fêmeas (%)</b>	98 (56,65)	101 (54,50)	75 (46,88)	97 (50,78)	49 (40,83)
<b>Machos (%)</b>	75 (43,35)	81 (44,50)	85 (53,12)	94 (49,22)	71 (59,17)
<b>Fêmeas / Machos</b>	1,31	1,25	0,88	1,03	0,69 <sup>a,b</sup>
<b>Corpo Lúteo</b>					
Total	205	205	189	218	143
Por Ninhada	12,81 ± 1,83	12,81 ± 2,43	12,60 ± 1,99	12,82 ± 2,19	11,92 ± 1,83
<b>Sítios de Implantação</b>					
Total	189	200	172	213	145
Por Ninhada	11,8 ± 1,9	12,5 ± 2,0	11,5 ± 3,4	12,5 ± 1,9	12,1 ± 2,0
<b>Reabsorções</b>					
Total	16	18	12	22	25 <sup>a,b,c,d</sup>
Por implantação (%)	8,4	9,0	6,9	10,3	17,2
Por Ninhada	1,00 ± 0,82	1,13 ± 1,20	0,80 ± 0,94	1,29 ± 2,11	2,08 ± 3,29
<b>Fetos Vivos</b>					
Total	173	182	160	191	120
Por implantação (%)	91,5	91,0	92,5	89,7	82,8
Por Ninhada	10,8 ± 2,4	11,4 ± 2,5	10,7 ± 3,4	11,2 ± 2,3	10,0 ± 3,4
<b>Peso Fetal</b>					
Individual	5,1 ± 0,3	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,4	5,3 ± 0,3	5,3 ± 0,3
Média por Ninhada	5,2 ± 0,2	5,1 ± 0,3	5,3 ± 0,3	5,3 ± 0,3	5,3 ± 0,2

Valores são média ± desvio padrão . Os valores percentuais foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney, ou por Qui-quadrado. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguido pelo teste t de Students. Em todos as análises, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . As letras indicam as diferenças encontradas como segue: a ≠ controle, b ≠ 125mg beta-ionona/kg, c ≠ 250mg beta-ionona/kg, e d ≠ 500mg beta-ionona/kg.

<sup>Ψ</sup>: Uma mãe deu à luz, por parto espontâneo, um feto morto no dia 21 de gestação

#### 4.2.2 CRESCIMENTO INTRA-UTERINO

Não foram encontrados indícios de retardo do crescimento pré-natal (intra-uterino) em consequência ao tratamento com beta-ionona, como pode ser constatado pela análise do peso do útero gravídico (Tabela 1), pelos pesos médios dos fetos no dia da cesárea (Tabela 3) e pela análise de sinais de retardo de ossificação.

Na análise de ganho médio de peso corporal dos fetos pode-se utilizar a ninhada como unidade estatística, ou alternativamente, o peso individual de cada feto. Este último procedimento estatístico tende a superestimar o efeito, devido ao grande número de animais avaliados, e tem um significado biológico questionável. No entanto, no presente estudo, mesmo quando a análise foi realizada com o peso individual do feto por grupo experimental, o peso médio dos fetos à termo não diferiu entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 3).

A análise de sinais de retardo de ossificação revelou que não houve diferença estatística entre os grupos quanto à ocorrência de fetos com ossos pobremente calcificados, ossos não calcificados ou ossos esponjosos. Estes resultados indicam que a beta-ionona não atrasou o desenvolvimento esquelético.

A Tabela 4 mostra os pesos dos órgãos (fixados) dos fetos expostos *in utero* à beta-ionona. Embora tenha ocorrido redução do peso relativo de órgãos como rins, baço e fígado em animais expostos a beta-ionona, esta alteração não se mostrou dose-relacionada. Uma única exceção foi a redução do peso relativo do coração, que ocorreu a partir do nível de dose de 500mg beta-ionona/kg de peso corpóreo.

**Tabela 4:** Peso dos órgãos (fixados) de fetos tratados com beta-ionona do dia 6 ao dia 15 de gestação.

Tratamento	Beta-ionona (mg/kg de peso corporal/dia)				
	0	125	250	500	1000
Nº de Ninhadas	16	16	14	17	12
Nº Total de Fetos	55	57	49	60	35
<b>Peso Fetal (g)</b>	5,215 ± 0,189	5,177 ± 0,323	5,295 ± 0,399	5,437 ± 0,258	5,542 ± 0,107
<b>Rim Esquerdo (g)</b>	0,012 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,012 ± 0,001
<i>% rim esquerdo</i>	0,230 ± 0,025	0,224 ± 0,019	0,211 ± 0,019 <sup>a</sup>	0,202 ± 0,022 <sup>a,b</sup>	0,214 ± 0,016
<b>Rim Direito (g)</b>	0,013 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,012 ± 0,002	0,012 ± 0,001	0,013 ± 0,001
<i>% rim direito</i>	0,243 ± 0,022	0,238 ± 0,017	0,228 ± 0,022	0,224 ± 0,020	0,233 ± 0,021
<b>Baço (g)</b>	0,006 ± 0,001	0,005 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,005 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,005 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,006 ± 0,001 <sup>b</sup>
<i>% baço</i>	0,109 ± 0,019	0,091 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,091 ± 0,018 <sup>a</sup>	0,092 ± 0,017 <sup>a</sup>	0,100 ± 0,017
<b>Fígado (g)</b>	0,461 ± 0,029	0,421 ± 0,033 <sup>a</sup>	0,426 ± 0,046 <sup>a</sup>	0,450 ± 0,049 <sup>b</sup>	0,473 ± 0,026 <sup>b,c</sup>
<i>% fígado</i>	8,840 ± 0,331	8,148 ± 0,605 <sup>a</sup>	8,057 ± 0,727 <sup>a</sup>	8,279 ± 0,628 <sup>a</sup>	8,554 ± 0,545
<b>Timo (g)</b>	0,008 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,001
<i>% timo</i>	0,145 ± 0,015	0,133 ± 0,016	0,134 ± 0,014	0,131 ± 0,015	0,133 ± 0,019
<b>Pulmão (g)</b>	0,137 ± 0,015	0,129 ± 0,016	0,157 ± 0,030 <sup>a,b</sup>	0,148 ± 0,027 <sup>b</sup>	0,142 ± 0,016
<i>% pulmão</i>	2,632 ± 0,271	2,507 ± 0,362	2,955 ± 0,516	2,723 ± 0,465	2,569 ± 0,277
<b>Coração (g)</b>	0,031 ± 0,002	0,029 ± 0,002	0,030 ± 0,003	0,030 ± 0,002	0,030 ± 0,002
<i>% coração</i>	0,590 ± 0,030	0,568 ± 0,034	0,576 ± 0,065	0,549 ± 0,042 <sup>a</sup>	0,547 ± 0,044 <sup>a</sup>

Os valores são média ± desvio padrão. % = Peso Relativo dos órgãos (peso absoluto do órgão (x 100)/ peso fetal); (g) = Peso Absoluto dos Órgãos. Para a análise dos pesos relativos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney, e para os valores absolutos foi realizado ANOVA seguido de teste t de Student. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$ . As letras indicam as diferenças encontradas como segue: a ≠ controle, b ≠ 125mg beta-ionona/kg, c ≠ 250mg beta-ionona/kg, e d ≠ 500mg beta-ionona/kg. Em toda a análise utilizou-se a ninhada como unidade de medida.

### **4.2.3 RAZÃO ENTRE FETOS FÊMEAS E MACHOS**

Na dose de 1000mg de beta-ionona/kg, o valor da razão entre o número de fetos fêmeas e machos foi praticamente a metade daquela observada no grupo controle (*i.e.* 0,69 e 1,31; respectivamente), sugerindo que as fêmeas foram mais suscetíveis aos efeitos embrioletais a beta-ionona (Tabela 3).

### **4.2.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS**

#### ***4.2.4.1 Alterações Visíveis Externamente***

As alterações visíveis externamente foram registradas no momento da cesárea, ocasião em que o feto é examinado minuciosamente. Esta análise é realizada na direção crânio-caudal e inclui o registro de reflexos primitivos (como *e.g.* retração das patas traseira frente a estímulo) e a observação quanto à ocorrência de hematomas, edema, abertura ocular, protusão de língua, inserção da orelha, entre outros. A beta-ionona não induziu alterações visíveis externamente, em nenhum dos níveis de dose estudados.

#### 4.2.4.2 Alterações Viscerais

Na Tabela 5 podemos observar a ocorrência de anomalias viscerais em ninhadas de ratos Wistar expostos *in utero* a beta-ionona. Alterações na forma, dilatação ou ausência de órgãos como testículo (Figura 9), epidídimo (Figura 10), útero, timo, glândula adrenal (Figuras 11 e 12), ureter, fígado (Figura 13) e coração foram alguns dos achados observados ocasionalmente nos animais do grupo controle e nos demais grupos experimentais. Não foi notado qualquer aumento consistente da incidência de anomalias viscerais causado pela exposição pré-natal à beta-ionona.

Dentre as malformações viscerais encontradas com maior frequência nos grupos expostos à beta-ionona (Tabela 5) podemos citar: 1. aumento da incidência de fetos com lóbulo extra no fígado (Figura 6), 2. discreto aumento da frequência de fetos com forma irregular do lóbulo medial esquerdo do fígado (Figura 7), 3. aumento da ocorrência de fetos apresentando cisto em um dos rins (Figura 15), 4. discreto aumento na frequência de fetos com ureter dilatado ou tortuoso, (Figura 16), 5. aumento da incidência de fetos com lóbulo extra no pulmão (Figura 8) e, por fim, 6. pequeno aumento na incidência de fetos apresentando alterações cardíacas, do tipo dilatação dos ventrículo esquerdo e direito. Das alterações descritas acima somente as de número 1, 3 e 5 estavam aumentadas nas doses mais altas de beta-ionona sugerindo que o efeito é dose-relacionado.



**Tabela 5:** Ocorrência de anomalias viscerais em fetos de ratas tratadas por via oral com beta-ionona (0, 125, 250, 500 e 1000 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 15 de gestação.

Tratamento	Beta-ionona (mg/kg de peso corpóreo/dia)				
	0	125	250	500	1000
<b>Fetos examinados ( ninhada)</b>	<b>55 (16)</b>	<b>57 (16)</b>	<b>49 (14)</b>	<b>60 (17)</b>	<b>35 (11)</b>
<b>Fêmeas examinadas (%)</b>	30 (54,54)	34 (59,65)	21 (42,86)	32 (53,33)	13 (37,14)
<b>Machos examinados (%)</b>	25 (45,45)	23 (40,35)	28 (57,14)	28 (46,66)	22 (62,86)
<b>TESTÍCULO</b>					
<b>Esquerdo</b>					
Ausente	1	0	0	0	0
<b>EPIDIDÍMO</b>					
Forma Irregular	0	1	0	0	0
<b>ÚTERO</b>					
<b>Corno Direito</b>					
Menor	1	0	0	0	1
Maior	0	0	0	1	0
Forma Irregular	0	2	0	0	0
<b>Corno Esquerdo</b>					
Menor	0	1	0	0	0
Dilatado	0	1	0	1	0
Forma Irregular	0	1	0	0	0
<b>Corno Direito e Esquerdo</b>					
Dilatado	0	2	0	3	0
Forma Irregular	1	1	0	0	0
<b>FÍGADO</b>					
Lóbulo Extra (%)	19(34,5)	25(43,9)	29(59,2) <sup>a</sup>	24(40,0) <sup>c</sup>	24(68,6) <sup>a,b,d</sup>
Hepatomegalia	0	0	0	1	0
<b>Lóbulo Medial Esquerdo</b>					
Forma Irregular (%)	2 (3,6)	9 (15,8) <sup>a</sup>	4 (8,2)	3 (5,0)	4 (11,4)
<b>Lóbulo Posterior Direito</b>					
Fissuras	0	1	0	0	1
<b>TIMO</b>					
Forma Irregular (%)	0(0)	7(12,3) <sup>a</sup>	2 (4,1)	2 (3,3)	0 (0) <sup>b</sup>
<b>RIM</b>					
<b>Direito</b>					
Forma Irregular	1	0	0	0	0
Cisto (%)	0(0)	5 (8,8) <sup>a</sup>	6 (12,3) <sup>a</sup>	7 (11,7) <sup>a</sup>	3 (8,6) <sup>a</sup>

<b>GLÂNDULA ADRENAL</b>					
<b>Esquerdo</b>					
Posição Irregular	0	2	0	1	0
Maior	0	0	0	1	0
<b>URETER</b>					
<b>Direito</b>					
Dilatado (%)	0(0)	3 (5,3)	1 (2,0)	3 (5,0)	2 (5,7)
Tortuoso	0	1	0	0	1
<b>Esquerdo</b>					
Dilatado (%)	2 (3,6)	7 (12,3)	5 (10,2)	4 (6,7)	3 (8,6)
Tortuoso (%)	3 (5,5)	11 (19,3) <sup>a</sup>	7 (14,3)	5 (8,3)	3 (8,6)
Menor	2	0	0	0	0
<b>Direito e Esquerdo</b>					
Dilatado (%)	0(0)	0(0)	5 (10,2) <sup>a,b</sup>	3 (5,0)	1 (2,9)
Tortuoso (%)	0(0)	0(0)	4 (8,2)	1 (1,7)	1 (2,9)
<b>PULMÃO</b>					
Lóbulo Extra (%)	5 (9,1)	24 (42,1) <sup>a</sup>	21 (42,9) <sup>a</sup>	15(25,0) <sup>a,b,c</sup>	15 (42,9) <sup>a</sup>
Forma Irregular	0	0	0	0	2
Lóbulos com Fissuras (%)	0(0)	3 (5,3)	3 (6,1)	1 (1,7)	3 (8,6)
<b>CORAÇÃO</b>					
Forma Irregular	1	0	0	0	0
Aurículas com Aspecto Esponjoso	0	2	1	0	0
<b>Ventrículo Direito</b>					
Dilatado	0	0	0	1	0
<b>Ventrículo Direito e Esquerdo</b>					
Dilatado (%)	0(0)	4 (7,0) <sup>a</sup>	10(20,4) <sup>a,b</sup>	5 (8,3) <sup>a</sup>	0(0) <sup>c</sup>
<b>CÉREBRO</b>					
<b>Ventrículos Laterais Direito e Esquerdo</b>					
<b>Esquerdo</b>					
Dilatados	0	2	0	0	0
<b>Ventrículo Lateral Direito</b>					
Dilatado	0	1	0	0	0
<b>Ventrículo Lateral Esquerdo</b>					
Forma Irregular	0	1	0	0	0
<b>IV Ventrículo</b>					
Dilatado	0	1	0	0	0

Valores: N<sub>0</sub> de fetos malformados (% de fetos malformados). As percentagens foram avaliadas pelo Teste de qui-quadrado ou, alternativamente, pelo Teste de Fisher. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$ . As letras indicam as diferenças encontradas como segue: a  $\neq$  controle, b  $\neq$  125mg beta-ionona/kg, c  $\neq$  250mg beta-ionona/kg, e d  $\neq$  500mg beta-ionona/kg.

#### 4.2.4.3 *Alterações Ósseas*

A Tabela 6 ilustra a ocorrência de malformações do esqueleto em fetos expostos à beta-ionona do dia 6 ao dia 15 de gestação.

Foi possível observar que muitas das anomalias estruturais encontradas nos grupos tratados com beta-ionona ocorreram também (e com frequências equivalentes) no grupo controle. Isto indica que há uma tendência ao aparecimento espontâneo destas alterações na linhagem de ratos utilizada neste estudo. É importante ressaltar, que o significado destes achados tem pouca relevância em termos de um possível efeito embriotóxico ou teratogênico da beta-ionona. Porém, como foram encontradas com frequência relativamente alta em todos os grupos experimentais, as alterações serão descritas a seguir:

##### **CRÂNIO:**

- **Ossos Supraoccipital** (forma irregular: controle = 10,17%; 125mgBI/kg = 14,4%; 250mgBI/kg = 8,11% ; 500mgBI/kg = 8,40% e 1000mgBI/kg = 15,29%) Figura 18;
- **Ossos Basisfenóide** (Bifurcação: controle = 0%; 125mgBI/kg = 0,80%; 250mgBI/kg = 0%; 500mgBI/kg = 0,76% e 1000mgBI/kg = 5,88%); (forma irregular: controle = 8,47%; 125mgBI/kg = 12,00%; 250mgBI/kg = 18,92%; 500mgBI/kg = 0% e 1000mgBI/kg = 12,94%) Figura 17;

##### **PATA DIANTEIRA:**

- **Processo Deltóide** (Forma Irregular, lado direito e esquerdo: controle = 0%; 125mgBI/kg = 3,20%; 250mgBI/kg = 3,60%; 500mgBI/kg = 4,58% e 1000mgBI/kg = 3,53%); (Forma Irregular, lado direito: controle = 5,08%;

125mgBI/kg = 9,60%; 250mgBI/kg = 4,50%; 500mgBI/kg = 1,53 e 1000mgBI/kg = 5,88%); (Forma Irregular, lado esquerdo: controle = 4,24%; 125mgBI/kg = 3,20%; 250mgBI/kg = 8,11%; 500mgBI/kg = 0% e 1000mgBI/kg = 2,35%)

### **ESTERNO:**

- **Esterno** (Esternebras não-alinhadas: controle = 14,41%; 125mgBI/kg = 12,8%; 250mgBI/kg = 23,42%; 500mgBI/kg = 16,79% e 1000mgBI/kg = 25,88%), Figura 20;

### **COLUNA:**

- **Axis** (Forma Irregular, lado direito e esquerdo: controle = 8,47%; 125mgBI/kg = 28,0%; 250mgBI/kg = 12,61%; 500mgBI/kg = 25,19 e 1000mgBI/kg = 18,82%);
- **Caudal** (Ponta de Cauda Curvada: controle = 5,93%; 125mgBI/kg = 12,00%; 250mgBI/kg = 0%; 500mgBI/kg = 3,05 e 1000mgBI/kg = 11,76%)

### **COSTELAS:**

- **Costela** (Curtas, lado direito e esquerdo: controle = 2,54%; 125mgBI/kg = 6,40%; 250mgBI/kg = 4,50%; 500mgBI/kg = 7,63 e 1000mgBI/kg = 4,71%); (Extra na coluna cervical, lado esquerdo: controle = 0%; 125mgBI/kg = 2,40%; 250mgBI/kg = 1,80%; 500mgBI/kg = 2,29 e 1000mgBI/kg = 4,71%), Figura 19. (Extra na coluna cervical, lado direito: controle = 0%; 125mgBI/kg = 0%; 250mgBI/kg = 3,60%; 500mgBI/kg = 0,76% e 1000mgBI/kg = 1,18%).

### **PATA TRASEIRA:**

- **2º Dedo** (Posição Irregular, lado esquerdo: controle = 1,69%; 125mgBI/kg = 1,60%; 250mgBI/kg = 0%; 500mgBI/kg = 0,76% e 1000mgBI/kg = 3,53%);
- **1º Metatarso** (Menor, lado direito e esquerdo: controle = 3,39%; 125mgBI/kg = 2,54%; 250mgBI/kg = 0%; 500mgBI/kg = 0 e 1000mgBI/kg = 10,59%)

Alterações como forma irregular do basisfenóide, forma irregular do processo deltóide, esternebras não-alinhadas e forma irregular do axis ocorreram com maior frequência no grupo tratado com a maior dose de beta-ionona, quando este grupo é comparado ao grupo controle.

Outras alterações estruturais importantes como escápula tortuosa, costelas tortuosas e polidactilia ([Figura 21](#), [22](#) e [23](#), respectivamente) foram encontradas no grupo que recebeu a maior dose de beta-ionona, mas ocorreram com frequência muito baixa (1,18%).

**Tabela 6:** Malformações esqueléticas encontradas em fetos de ratos tratados com Beta-ionona (0, 125, 250, 500 e 1000 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 15 de gestação.

Tratamento	Beta-ionona (mg/kg de peso corpóreo/dia)					
	Controle Histórico	0	125	250	500	1000
<b>Total de fêmeas Tratadas</b>		17	17	18	18	20
<b>Total de fêmeas Grávidas</b>	148	16	16	15	17	12
<b>Total de fetos Analisados</b>	1.288	118	125	111	131	85
<b>CRÂNIO</b>						
<b>PARIETAL</b>						
<b>Direito</b>						
Centro de Ossificação Adicional	4 (0,31)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>INTERPARIETAL</b>						
Centro de Ossificação Adicional	7 (0,54)	6,25 (0,85)	18,75 (2,40)	13,33 (1,80)	0 (0)	0 (0)
<b>SUPRAOCCIPITAL</b>						
Forma Irregular	34 (2,64)	56,25 (10,17)	62,50 (14,40)	46,67 (8,11)	35,29 (8,40)	66,67 (15,29)
<b>ESCAMOSO</b>						
<b>Direito e Esquerdo</b>						
Forma Irregular	8 (0,62)	25,00 (4,24)	18,75 (3,20)	13,33 (1,80)	17,65 (2,29)	16,67 (3,53)
<b>Direito</b>						
Forma Irregular	27 (2,10)	43,75 (5,93)	50,00 (8,00)	53,33 (10,81)	47,05 (9,16)	41,67 (10,59)
<b>Esquerdo</b>						
Forma Irregular	35 (2,72)	50,00 (6,78)	56,25 (10,40)	53,33 (8,11)	29,41 (6,87)	25,00 (3,53)
<b>BASISFENÓIDE</b>						
Bifurcação	17 (1,32)	0 (0)	6,25 (0,80)	0 (0)	5,89 (0,76)	16,67 (5,88) <sup>a,b,c</sup>
Forma Irregular	37 (2,87)	50,00 (8,47)	56,25 (12,00) <sup>a</sup>	60,00 (18,92) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a,b,c</sup>	41,67 (12,94) <sup>d</sup>
Centro de Ossificação Adicional	1 (0,08)	0 (0)	0 (0)	6,67 (0,90)	0 (0)	0 (0)
<b>PATA DIANTEIRA</b>						
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	5 (0,39)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	2 (0,16)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>ESCÁPULA</b>						
<b>Direito e Esquerdo</b>						
Tortuosa	1 (0,08)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)

<b>PROCESSO DELTOÍDE</b>						
<b>Direito e Esquerdo</b>						
Forma Irregular	34 (2,64)	0 (0)	25,00 (3,20) <sup>a</sup>	20,00 (3,60) <sup>a</sup>	23,52 (4,58) <sup>a</sup>	16,67 (3,53) <sup>a</sup>
<b>Direito</b>						
Forma Irregular	22 (1,71)	31,25 (5,08)	37,50 (9,60)	26,67 (4,50)	11,77 (1,53) <sup>b</sup>	25,00 (5,88)
<b>Esquerdo</b>						
Forma Irregular	16 (1,24)	18,75 (4,24)	18,75 (3,20)	40,00 (8,11)	0 (0) <sup>a,b,c</sup>	16,67 (2,35)
<b>DEDO</b>						
<b>(Todos os dedos)</b>						
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	2 (0,16)	0 (0)	6,25 (0,80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	1 (0,08)	0 (0)	12,5 (1,60)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>2º Dedo</b>						
<b>Direito e Esquerdo</b>						
Posição Irregular	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	2 (0,16)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5,89 (0,76)	8,33 (2,35)
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	1 (0,08)	0 (0)	12,5 (1,60)	13,33 (1,80)	0 (0)	0 (0)
<b>5º Dedo</b>						
<b>Direito e Esquerdo</b>						
Posição Irregular	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	2 (0,16)	0 (0)	0 (0)	6,67 (0,90)	5,89 (0,76)	0 (0)
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	1 (0,08)	12,50 (1,69)	6,25 (0,80)	6,67 (0,90)	5,89 (0,76)	0 (0)
<b>ESTERNO</b>						
<b>ESTERNEBRAS</b>						
<b>4ª Esternebra</b>						
Duas ossificações Centrais	1 (0,08)	0 (0)	6,25 (0,80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>5ª Esternebra</b>						
Duas ossificações Centrais	4 (0,31)	0 (0)	6,25 (0,80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Esternebras não-alinhadas</b>	66 (5,12)	68,75 (14,41)	68,75 (12,80)	86,67 (23,42) <sup>a,b</sup>	76,47 (16,79)	75,00 (25,88) <sup>a,b</sup>
<b>COLUNA</b>						
<b>AXIS</b>						
<b>Direito e Esquerdo</b>						
Forma Irregular	4 (0,31)	37,50 (8,47)	81,25 (28,00) <sup>a</sup>	60,00 (12,61) <sup>b</sup>	58,82(25,19) <sup>a,c</sup>	66,67 (18,82) <sup>a</sup>
<b>Direito</b>						
Forma Irregular	0 (0)	56,25 (10,17)	75,00 (11,20)	53,33 (9,91)	41,17 (7,63)	41,67 (8,24)

<b>Esquerdo</b>						
Forma Irregular	9 (0,70)	75,00 (17,80)	75,00 (20,00)	80,00 (24,32)	94,12 (26,72)	91,67 (22,35)
<b>TORÁCICA</b>						
<b>Afetado uma ou duas vezes</b>						
Ossificação Central no Início de fechamento	1 (0,08)	0 (0)	31,25 (4,00)	20,00 (2,70)	17,65 (3,82)	0 (0)
Dumb-bell	5 (0,39)	0 (0)	6,25 (1,60)	0 (0)	11,77 (1,53)	0 (0)
Ossificação Central Dividida	2 (0,16)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>Ventral (canal)</b>						
<b>Afetado uma ou duas vezes</b>						
Ossificação Central no Início de fechamento	12 (0,93)	0 (0)	18,75 (4,00)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Afetado três ou um pouco mais</b>						
Ossificação Central no Início de fechamento	0 (0)	0 (0)	6,25 (0,80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>LOMBAR</b>						
<b>Ventral</b>						
<b>Afetado uma ou duas vezes</b>						
Ossificação Central no Início de fechamento	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6,67 (0,90)	0 (0)	0 (0)
Ossificação Central dividida-assimétrica	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6,67 (0,90)	0 (0)	0 (0)
<b>Lateral Esquerdo</b>						
Centro de Ossificação Adicional	0 (0)	6,25 (0,85)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>CAUDAL</b>						
Cauda Encrespada	4 (0,31)	56,25 (9,32)	50,00 (6,40)	13,33 (3,60)	29,41 (4,58)	33,33 (7,06)
Ponta de Cauda Curvada	10 (0,78)	37,50 (5,93)	75,00 (12,00)	0 (0) <sup>a,b</sup>	11,77 (3,05) <sup>b</sup>	58,33 (11,76) <sup>c,d</sup>
<b>COSTELA</b>						
<b>Direito e Esquerdo</b>						
<b>Afetado Três vezes ou mais vezes</b>						
Curto	43 (3,34)	12,50 (2,54)	37,50 (6,40)	13,33 (4,50)	41,17 (7,63) <sup>a</sup>	16,67 (4,71)
<b>Esquerdo</b>						
<b>Afetado uma ou duas vezes</b>						
Tortuosas	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>Direito</b>						
<b>Afetado uma ou duas vezes</b>						
Tortuosas	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>Direito e Esquerdo</b>						
Costela Extra na Cervical	7 (0,54)	6,25 (0,85)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)



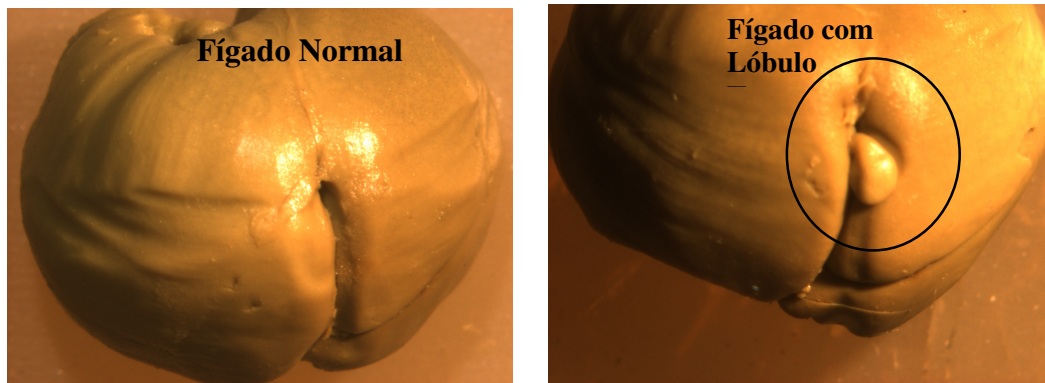
<b>Direito</b>						
Costela Extra na Lombar	1 (0,08)	0 (0)	12,50 (1,60)	6,67 (0,90)	5,89 (0,76)	0 (0)
Costela Extra na Cervical	6 (0,47)	0 (0)	0 (0)	13,33 (3,60) <sup>a,b</sup>	5,89 (0,76)	8,33 (1,18)
<b>Esquerdo</b>						
Costela Extra na Lombar	1 (0,08)	6,25 (0,85)	12,50 (1,60)	6,67 (0,90)	5,89 (0,76)	16,67 (3,53)
Costela Extra na Cervical	5 (0,39)	0 (0)	6,25 (2,40)	13,33 (1,80)	17,65 (2,29)	25,00 (4,71) <sup>a</sup>
<b>Totalmente Afetado</b>						
Tortuosas	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>PATA TRASEIRA</b>						
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	0 (0)	12,50 (1,69)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	1 (0,08)	0 (0)	6,25 (0,80)	6,67 (0,90)	5,89 (0,76)	8,33 (1,18)
Polidactilia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>PUBIS</b>						
<b>Direito</b>						
Ausente	0 (0)	6,25 (0,85)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>DEDOS</b>						
<b>(Todos os dedos)</b>						
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	1 (0,08)	0 (0)	0 (0)	6,67 (0,90)	0 (0)	0 (0)
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6,67 (0,90)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>1º Dedo</b>						
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	0 (0)	6,25 (0,85)	6,25 (0,80)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>2º Dedo</b>						
<b>Direito e Esquerdo</b>						
Posição Irregular	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	1 (0,08)	12,50 (1,69)	12,50 (1,60)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	0 (0)	12,50 (1,69)	12,50 (1,60)	0 (0)	5,89 (0,76)	16,67 (3,53) <sup>c,d</sup>
<b>3º Dedo</b>						
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	0 (0)	12,50 (1,69)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	1 (0,08)	6,25 (0,85)	6,25 (0,80)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>4º Dedo</b>						

<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	4 (0,31)	18,75 (3,39)	12,5 (1,60)	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	16,67 (2,35)
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	1 (0,08)	0 (0)	6,25 (0,80)	0 (0)	0 (0)	8,33 (1,18)
<b>5º Dedo</b>						
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	0 (0)	6,25 (0,85)	6,25 (0,80)	0 (0)	0 (0)	16,67 (2,35)
<b>METATARSO</b>						
<b>1º Metatarso</b>						
<b>Direito e Esquerdo</b>						
Menor	5 (0,39)	18,75 (3,39)	18,75 (2,54)	0 (0)	0 (0)	33,33(10,59) <sup>a,b,c,d</sup>
<b>FALANGE</b>						
<b>1º Falange Distal</b>						
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6,67 (0,90)	0 (0)	0 (0)
<b>2º Falange Distal</b>						
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6,67 (0,90)	5,89 (0,76)	0 (0)
<b>3º Falange Distal</b>						
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	1 (0,08)	6,25 (0,85)	0 (0)	6,67 (0,90)	5,89 (0,76)	0 (0)
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	0 (0)	0 (0)	6,25 (0,80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>4º Falange Distal</b>						
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	0 (0)	0 (0)	12,50 (1,60)	6,67 (0,90)	0 (0)	0 (0)
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6,67 (0,90)	0 (0)	0 (0)
<b>5º Falange Distal</b>						
<b>Direito</b>						
Posição Irregular	0 (0)	0 (0)	6,25 (0,80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Esquerdo</b>						
Posição Irregular	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5,89 (0,76)	0 (0)

Os valores são: % de ninhadas (% de fetos). As percentagens foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado ou, alternativamente, pelo teste de Fisher (ninhada como unidade de medida). Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$ . As letras indicam as diferenças encontradas como segue: a  $\neq$  controle, b  $\neq$  125mg beta-ionona/kg, c  $\neq$  250mg beta-ionona/kg, e d  $\neq$  500mg beta-ionona/kg.

**Fotos de alterações viscerais observadas em fetos de ratas controles e tratadas com beta-ionona no período da organogênese**

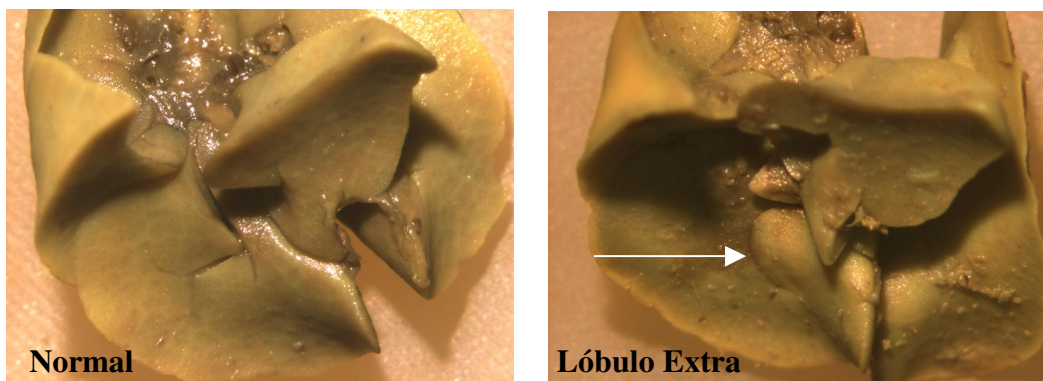
**Figura 6 – Fígado Normal e Fígado com Lóbulo Extra**



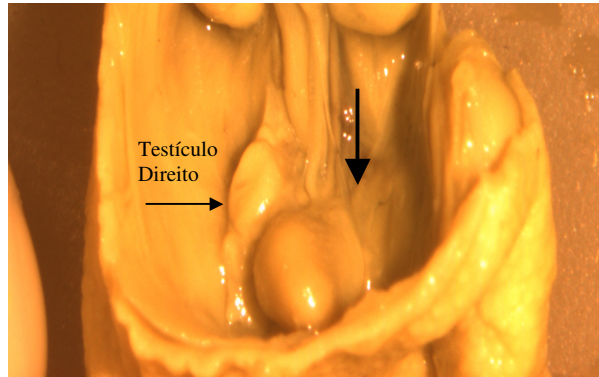
**Figura 7 - Forma Irregular do Lóbulo Medial Esquerdo do Fígado**



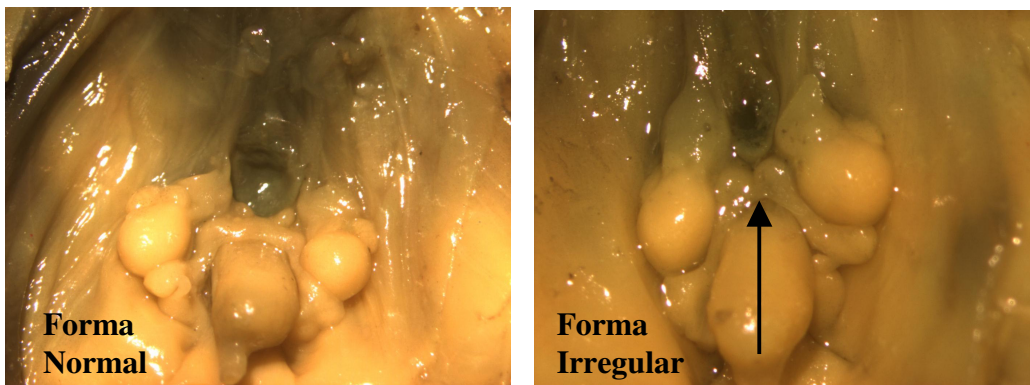
**Figura 8 – Pulmão Normal e Pulmão com Lóbulo Extra**



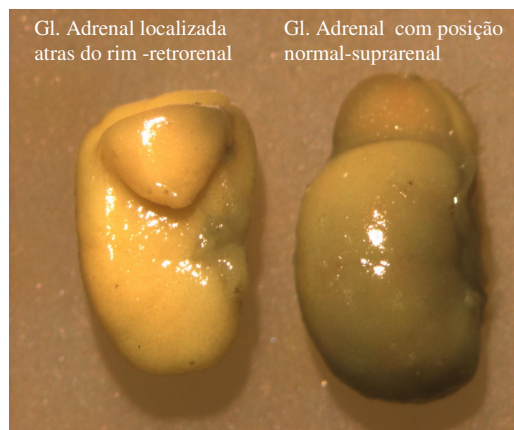
**Figura 9 - Ausência do Testículo Esquerdo**



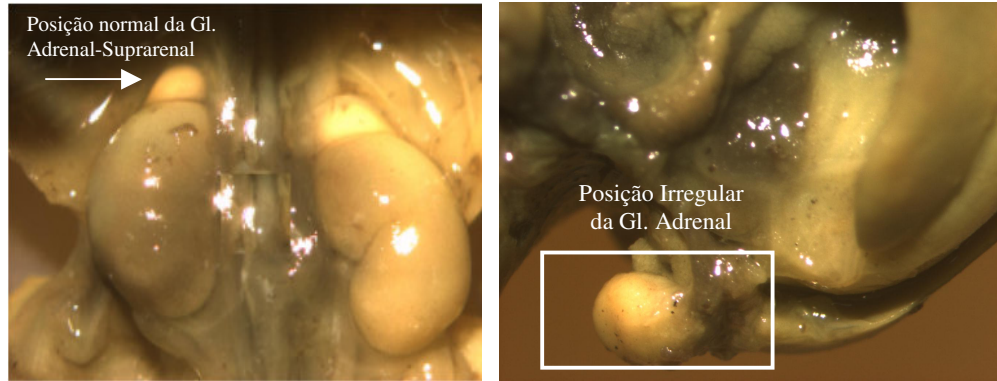
**Figura 10 – Epididímo com Forma Normal e Epididímo com Forma Irregular**



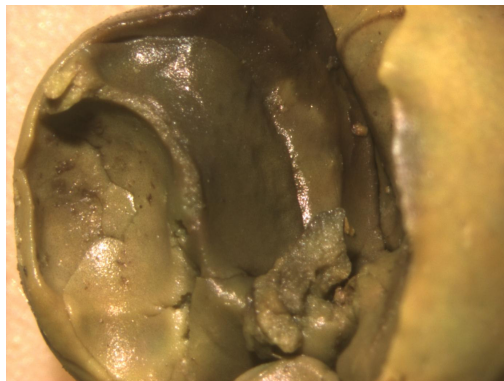
**Figura 11 - Posição Irregular da Glândula Adrenal (1)**



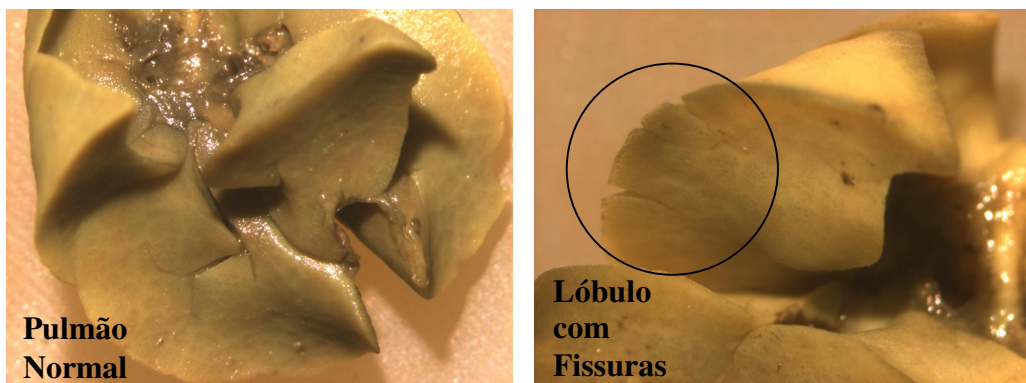
**Figura 12 - Posição Irregular da Glândula Adrenal (2)**



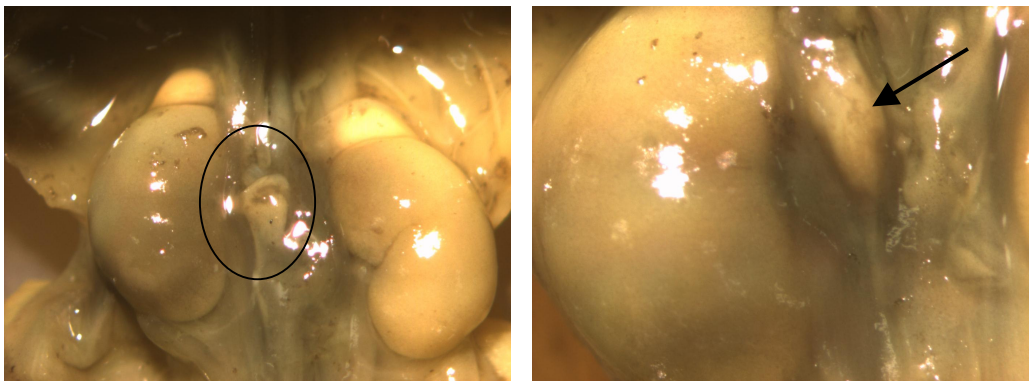
**Figura 13 - Alteração no Tamanho do Fígado (Hepatomegalia)**



**Figura 14 – Pulmão Normal e Lóbulo Pulmonar com Fissuras**

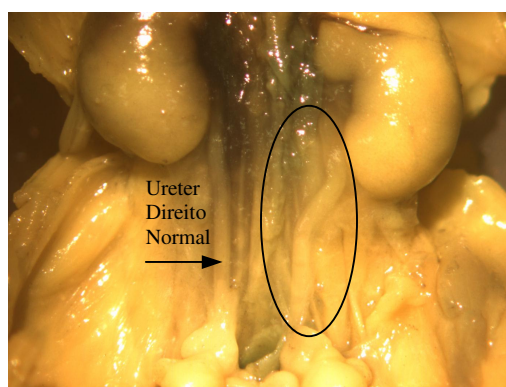


**Figura 15 – Cisto Próximo ao Rim Direito**



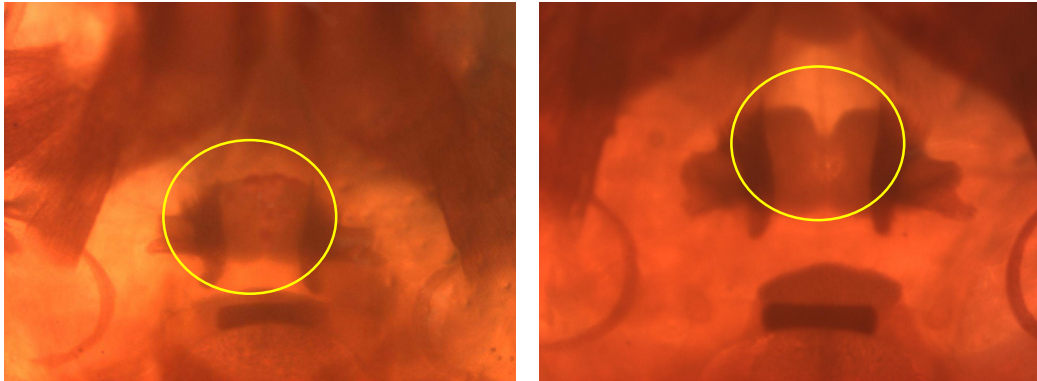
**(Detalhe em maior aumento)**

**Figura 16 - Ureter Dilatado e Tortuoso**



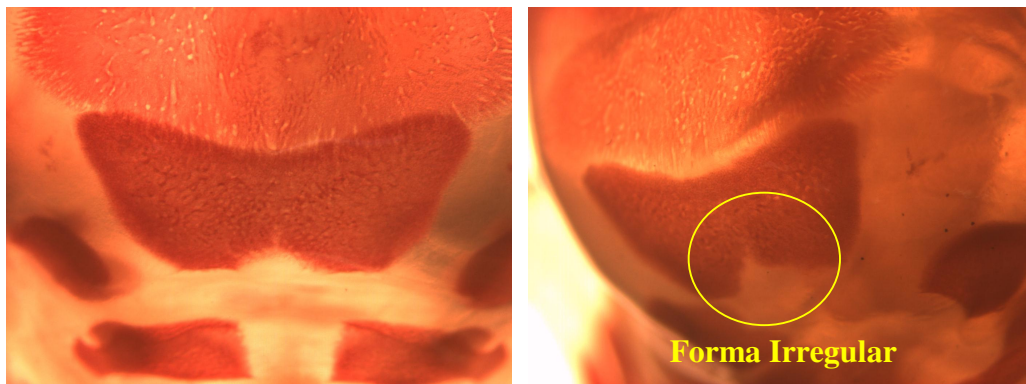
**Fotos de alterações ósseas observadas em fetos de ratas controles e tratadas com beta-ionona no período da organogênese**

**Figura 17 - Osso Basisfenóide com Forma Irregular**



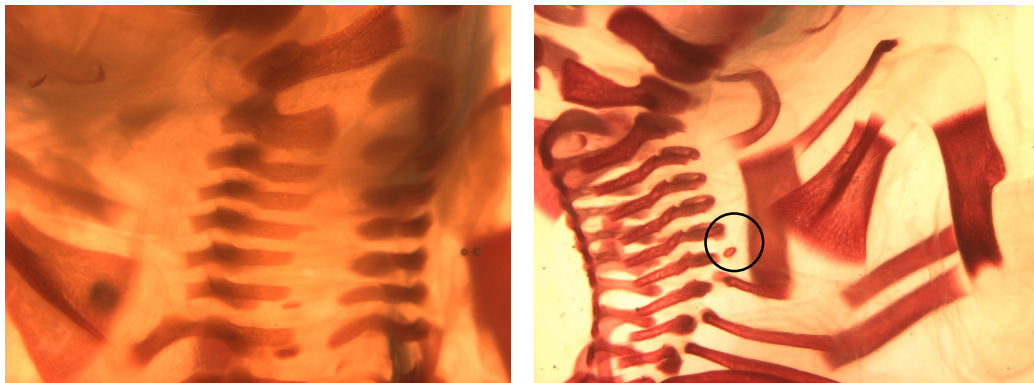
**Normal**

**Figura 18 - Osso Supraoccipital com Forma Irregular**



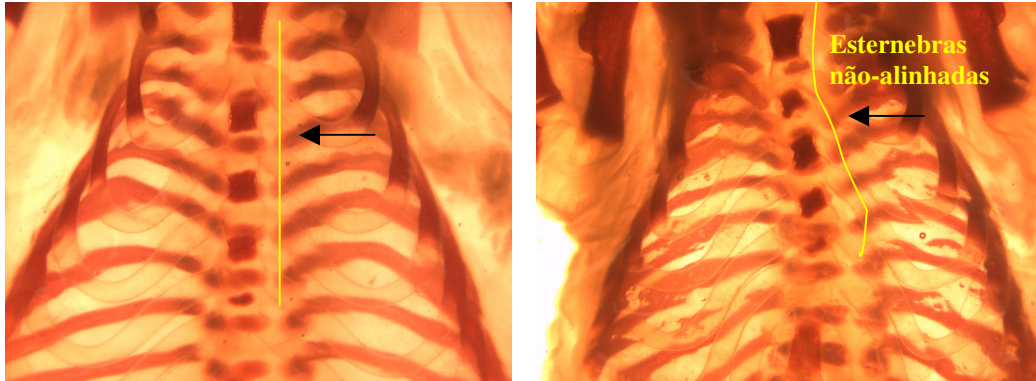
**Normal**

**Figura 19 - Costela Adicional Rudimentar na Coluna Cervical**



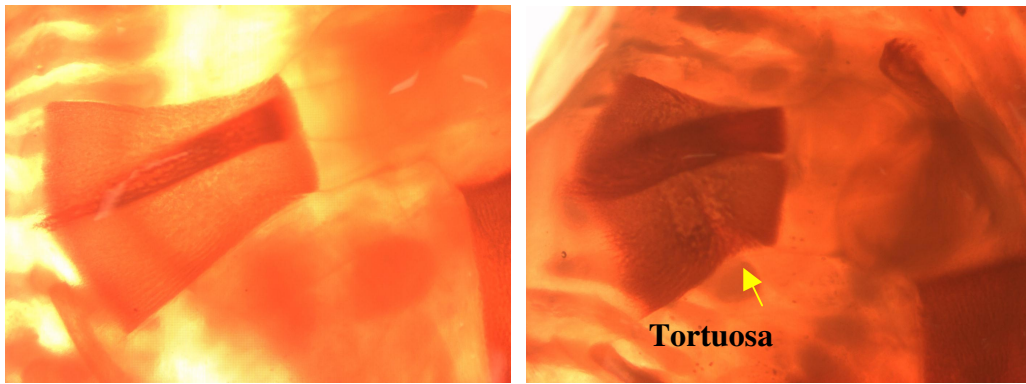
**Normal**

**Figura 20 – Esternebras não-alinhadas**



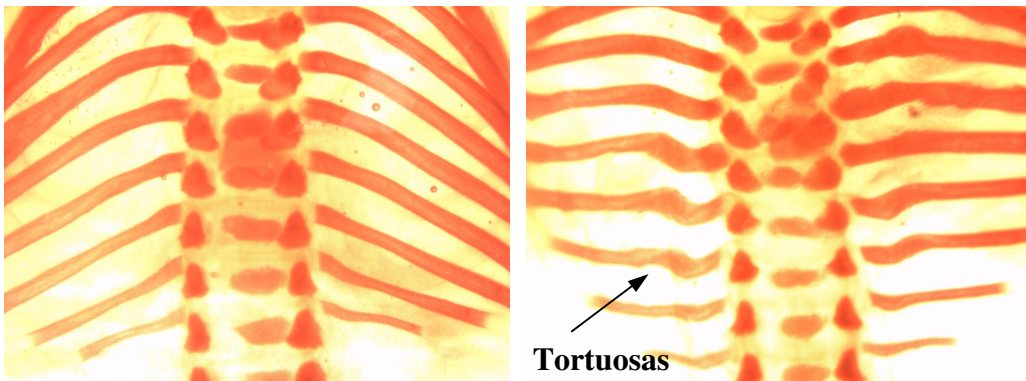
**Normal**

**Figura 21 - Escápula Tortuosa**



**Normal**

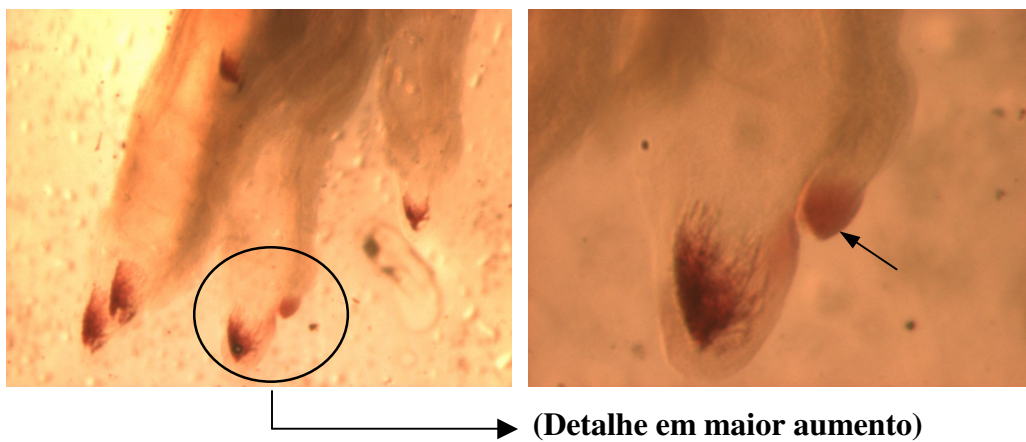
**Figura 22 - Costelas Tortuosas**



**Normal**



**Figura 23 – Polidactilia**



## 5. DISCUSSÃO

---

### 5.1 Toxicidade Materna

Para avaliar o efeito tóxico de um determinado agente químico durante a gestação, é preciso levar em conta que a toxicocinética pode ser modificada por essa condição fisiológica que envolve não somente o organismo materno e sim uma nova unidade denominada unidade “*materno-placentária-fetal*” (Lemonica, 2003). Em virtude disto, vários estudos mostram que a manutenção da homeostasia, ou seja, da constância do meio interno é essencial ao desenvolvimento embriofetal normal. Assim sendo o aparecimento do efeito embriotóxico de uma substância química pode resultar da interação desta substância com outros fatores que incidem sobre o organismo materno, como *e.g.* o estado nutricional, idade materna, estresse e outros fatores ambientais (Chahoud et al., 2002; Kuriyama et al., 2000; Noda et al., 2001; Chernoff et al. 1988; Chernoff et al. 1989)

Há diversos exemplos de que a manutenção da homeostasia materna é essencial para o adequado desenvolvimento embriofetal. Como demonstrado por Chernoff et al. (1988), o estresse experimentado pela mãe durante a gestação pode afetar adversamente o desenvolvimento pré- e/ou pós-natal, além de ser capaz de potencializar o efeito teratogênico de alguns xenobióticos. Algumas doenças maternas, tais como o diabetes melito (Brydon et al. 2000) e estados como a hipertermia (Edwards et al. 1995) podem igualmente comprometer os processos normais de embriogênese.

Há estimativas de que o risco de nascimento de crianças malformadas em gestações de mães diabéticas é cerca de 3 a 4 vezes maior do que na gestação normal (Larsen, 1986; Moore & Persaud, 1993). Níveis elevados de glicose no sangue são especialmente preocupantes no primeiro trimestre da gestação, fase em que muitas mulheres ainda desconhecem o fato de estarem grávidas. Alguns dos defeitos

congênitos associados ao diabetes são *spina bífida*, defeitos cardíacos, ósseos e do trato urinário, digestivo e reprodutivo. Já nos casos de diabetes controlada com terapia de insulina, o risco de ocorrência de malformações congênitas e/ou morte do embrião é bem menor. Acredita-se que alterações nos níveis de glicose, e não no nível de insulina, sejam a causa dos efeitos teratogênicos associados ao diabetes. Em mamíferos, a ocorrência de alterações no nível de glicose na fase inicial da gestação, mesmo que por curto espaço de tempo, é suficiente para aumentar a incidência de malformações congênitas e/ou óbitos ao nascimento.

Assim como nos distúrbios descritos acima, a ação de xenobióticos sobre o organismo materno pode alterar o desenvolvimento normal da prole. No entanto, nem sempre a toxicidade materna está associada à indução de anormalidades do desenvolvimento embriofetal. O estireno, por exemplo, mesmo em níveis de dose altamente tóxicos para a mãe não causa alterações embriofetais, provavelmente porque seus mecanismos tóxicos não envolvem a indução de danos teciduais (Murray *et al*, 1978).

A interpretação de efeitos adversos sobre o desenvolvimento da prole, em níveis de dose tóxicos para o organismo materno, ainda é difícil porque é praticamente impossível distinguir os efeitos embriotóxicos diretos decorrentes da exposição transplacentária a um dado agente (através da interação direta da substância com o embrião), daqueles induzidos indiretamente, em consequência de alteração da fisiologia materna (Khera, 1984 e 1985; Chernoff *et al* 1988, 1989 e Chahoud *et al* 1999). Nos estudos de toxicidade pré-natal, a toxicidade materna é, via de regra, confirmada por avaliações que podem incluir:

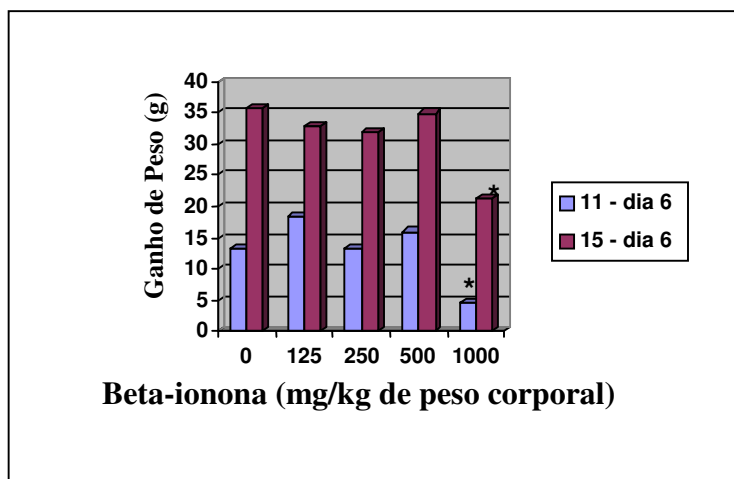
1. redução do ganho de peso corpóreo,
2. ocorrência de óbitos maternos durante o período de tratamento,
3. redução do consumo de água e/ou ração,

4. aparecimento de sinais clínicos, e
5. alterações no peso e/ou morfologia dos órgãos.

Nas diretrizes internacionais recomenda-se que os estudos de toxicidade reprodutiva, além de conduzidos de forma a viabilizar a avaliação da relação dose-efeito, apresentem pelo menos um nível de dose que produza alguma toxicidade materna, não mais de 10% de mortalidade das mães expostas ao agente em questão (Collins *et al*, 1999). Em nosso estudo, atendemos a esta recomendação, uma vez que a beta-ionona foi claramente tóxica para as mães no maior nível de dose testado.

Tal efeito foi evidenciado tanto pela pelo aparecimento de sinais clínicos de toxicidade, como pela redução do ganho de peso materno durante todo o período de tratamento (dias 6 a 15 de gestação), como pode ser visto na Figura 24. Também no período compreendido entre os dia 6 e 11 de gestação, fica clara a redução de ganho de peso materno. Como nesse momento o peso dos embriões é muito pequeno para explicar a redução do ganho de peso materno, pode-se concluir que a toxicidade observada diz respeito àquela vivenciada pela mãe.

**Figura 24** : Ganho médio de peso em ratas tratadas com beta-ionona no período entre os dias 6 e 15 de gestação.



\*  $p < 0,05$

Ao incluímos como limite superior do intervalo de doses testado, um nível de dose tóxico para o organismo materno, aumentamos a probabilidade de atingir faixas de dose capazes de produzir algum tipo de dano ao desenvolvimento embriofetal. No entanto, mesmo em nível de dose claramente tóxico para a mãe, a beta-ionona não alterou o crescimento pré-natal, nem induziu alterações morfológicas significativas na prole exposta entre os dias 6 e 15 de gestação, como será discutido a seguir.

## **5.2 Embriotoxicidade**

Os efeitos de um agente embriotóxico podem aparecer na forma de malformações, *déficit* funcional, retardo de desenvolvimento geral ou específico ou letalidade, dependendo do tipo de agente, da dose e frequência de exposição e do estágio de desenvolvimento no qual se encontra o conceito no momento da exposição.

Em estudos de toxicidade pré-natal, o potencial embriotóxico de um dado agente é determinado através dos seguintes desfechos:

1. embrioletalidade
2. retardo do crescimento intra-uterino; e
3. alterações morfológicas:
  - 3.1 alterações viscerais
  - 3.2 alterações ósseas

### 5.2.1 Embriotoxicidade: Embrioletalidade

Neste estudo, foi observada uma redução significativa da proporção de fêmeas tratadas (*i.e.* fêmeas com espermatozóides no esfregaço vaginal) /fêmeas grávidas (*i.e.* fêmeas com fetos ou pontos de implantação no útero) no maior nível de dose estudado, como mostra a Tabela 7. Esse dado indica que, nestas condições experimentais, a beta-ionona afetou a implantação do blastocisto no útero materno, induzindo perdas pré- e/ou peri-implantação.

Este efeito é consistente com o que havia sido notado em estudo anterior do laboratório. Após tratamento com beta-ionona por dose única, no dia 11 de gestação, Gomes-Carneiro et al. (2003) observaram drástico efeito embrioletal com percentual de reabsorção por implantação igual a 95% nos animais tratados com a dose de 1000mg/kg de peso corpóreo. No presente estudo, este percentual foi de apenas 17,2% neste mesmo nível de dose (Tabela 7). As diferenças entre o tratamento único com beta-ionona (Gomes-Carneiro *et al.*, 2003) e o do estudo atual com doses repetidas diariamente por todo período de embriogênese se fazem evidentes também na análise do número médio de fetos vivos por ninhada, como pode ser observado na Tabela 7. No presente estudo, o número médio de fetos vivos por ninhada foi de  $10,0 \pm 3,4$  no grupo de dose tratado com 1000mg beta-ionona/kg, enquanto valores inferiores a 1,0 feto por ninhada foram observado após tratamento único com beta-ionona ( $0,6 \pm 1,9$ ).

As diferenças descritas acima se dão provavelmente por duas razões. A primeira delas diz respeito à relação existente entre o tipo de efeito observado e o momento em que se deu o tratamento em cada um dos estudos em questão. Perdas pré- e/ou peri-implantação não poderiam ser observadas no estudo de Gomes-Carneiro *et al.* (2003), já que o tratamento com beta-ionona ocorreu cerca de 5 dias depois (*i.e.* dia 11 de gestação) do dia previsto para a implantação do blastocisto no útero materno em ratos (aproximadamente no dia 6 de gestação).

O segundo ponto a ser levado em consideração é a possível tolerância adquirida pelo organismo materno e por sua prole após tratamento continuado com a beta-ionona. É interessante notar que embora a beta-ionona, quando administrada do dia 6 ao dia 15 de gestação, tenha causado uma redução da razão de fêmeas tratadas por fêmeas grávidas, ela não causou uma diminuição do número médio de implantações por ninhada nas fêmeas remanescentes do grupo tratado com a maior dose. Este fato sugere que as fêmeas de ratos Wistar são mais suscetíveis aos efeitos pré-natais da beta-ionona na fase inicial de tratamento e que, passado este primeiro momento, ocorre tolerância a este terpenóide. Esta suposição é também sustentada pela análise do ganho de peso materno e pelos sinais de toxicidade observados durante a gestação. Nas fêmeas do grupo de 1000mg beta-ionona/kg, observamos uma drástica redução do ganho de peso materno, e esta redução foi mais evidente nos cinco primeiros dias após o início da exposição (dia 6 ao dia 11 de gestação), do que no tratamento como um todo (dia 6 ao dia 15 de gestação). Alterações clínicas observadas em decorrência da exposição à beta-ionona também foram, em sua grande maioria, evidenciadas nas primeiras 24 horas após o início do tratamento com doses repetidas.

Além disso, no estudo atual, observamos claramente uma diferença inter-individual quanto à suscetibilidade das fêmeas aos efeitos induzidos *in utero* pela beta-ionona. Enquanto, em algumas mães, a ocorrência de perdas pré- e/ou peri-implantação foi evidente (somente 60% do grupo tratado com 1000mg beta-ionona/kg apresentou feto vivo ou ponto de implantação no útero) em outras este efeito parece não ter ocorrido, uma vez que as demais mães deste grupo de dose não diferiram do grupo controle quanto ao número médio de implantações por ninhada. Sendo assim, podemos dizer que a beta-ionona tendeu a um efeito tudo-ou-nada: *i.e.* ou matou toda a ninhada ou a não a afetou (e não induziu mortes intra-ninhada). Este efeito, somado aos indícios de toxicidade materna observados neste nível de dose, sugere que a perda pré- e/ou peri-implantação de toda a ninhada é um efeito mediado pelo organismo materno. Citral e alfa-terpineno, *i.e.* monoterpenos encontrados em óleos essenciais de uma variedade de plantas, também induziram perdas peri-implantação de toda a

ninhada (Nogueira et al., 1995 e Araújo et al., 1996), de forma semelhante à observada para a beta-ionona.



**Tabela 7.** Análise comparativa da toxicidade materna e da embriotoxicidade induzida em ratos Wistar pela beta-ionona (BI) após tratamento com dose única ou após tratamento com doses repetidas durante todo o período de embriogênese.

Tratamento	BI (mg/kg peso corporal) (dose única, dia 11 de gravidez)			BI (mg/kg peso corporal) (doses repetidas, dias 6 a 15 de gravidez)		
	0	500	1000	0	500	1000
Fêmeas tratadas (N)	-	12	11	17	18	20
Fêmeas grávidas (N)	22	9	10	16	17	12*
Fêmeas tratadas/grávidas (%)		83	91	94	94	60*
Reabsorções de toda ninhada	0	1	9	0	0	0
Peso útero gravídico	66,9±10,8	61,6±30,2	4,6±12,5*	71,6±13,7	76,8±15,6	68,2±23,6
Ganho de peso materno (g)						
Dia 6-15	ND	ND	ND	35,8±11,2	34,9±13,2	21,2±13,6*
Dia 11-21	78,7±15,1	74,3±25,6	1,0±25,8*	87,2±17,5	88,8±17,4	78,9±26,8
Dia 0-21	112,1±19,6	126,4±30,1	53,6±25,0*	121,9±14,4	130,2±25,6	109,0±32,9
Dia 0-21 ( <i>menos o peso do útero</i> )	45,9±16,8	64,9±11,1	49,0±16,1	50,3±11,0	53,4±18,8	40,8±11,9
Reabsorções						
Total (N)	35	36	114	16	22	25
Por implantação (%)	13,1	29,8	95,0*	8,4	10,3	17,2*
Fetos vivos						
Total (N)	232	85	6	173	191	120
Por ninhada	10,5±2,0	9,4±5,0	0,6±1,9*	10,8±2,4	11,2±2,3	10,0±3,4
Fonte	Gomes-Carneiro <i>et al</i> , 2003			Presente Estudo		

Valores: média ± desvio padrão. \*: $\neq$  controle ( $P \leq 0,05$ ).

### 5.2.2 Embriotoxicidade: Efeitos sobre o crescimento intra-uterino

Embora a beta-ionona tenha causado toxicidade materna no maior nível de dose estudado, não foram observados indícios de retardo do crescimento pré-natal.

Como parâmetros normalmente utilizados para a análise de possíveis efeitos sobre o crescimento intra-uterino podemos citar (Chahoud & Paumgarten 2005):

1. peso do útero gravídico,
2. peso médio dos fetos no momento da cesárea, e
3. investigação de sinais de retardo de ossificação, como *e.g.* fetos com ossos pobremente calcificados, ossos não-calcificados ou ossos esponjosos.

No presente estudo não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados com beta-ionona e o grupo controle em relação a esses parâmetros.

A análise do peso médio dos fetos à termo pode ser realizada de duas maneiras distintas: considerando-se a ninhada (peso fetal médio por ninhada) ou o feto individual (peso fetal médio por grupo) como unidade de análise estatística. A utilização da ninhada como unidade de análise nos parece mais apropriada porque a mãe/ninhada é a unidade de tratamento, e não o feto individual. Assim, o uso do feto individual para este tipo de análise tende a inflacionar artificialmente o tamanho da amostra e por isso superestima o efeito observado. Ainda assim cabe dizer que, no presente estudo, mesmo quando o peso fetal individual foi calculado, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

### 5.2.3 Embriotoxicidade: Alterações Morfológicas

Nem toda alteração morfológica ou anomalia observada no feto à termo tem o mesmo grau de relevância. Algumas são de caráter incapacitante ou incompatíveis com a vida, outras porém são consideradas malformações menores ou simplesmente variações. Algumas variações e malformações menores são alterações visíveis de ordem meramente estética, que não afetam de outra forma a vida do portador.

A avaliação de anomalias de esqueleto nos estudos experimentais é extremamente sensível e leva a identificação e registro de inúmeras alterações ou desvios da normalidade cujo grau de severidade precisa ser considerado caso a caso. Como regra geral, todavia, pode-se dizer que as seguintes situações indicariam uma menor gravidade da ocorrência:

1. alterações viscerais e ósseas encontradas em alta frequência espontânea em controles históricos<sup>4</sup> e no grupo controle do próprio experimento;
2. alterações sabidamente reversíveis, *i.e.* aquelas que apresentam baixa gravidade e não representam riscos à vida e podem ser corrigidas ou adaptadas com o desenvolvimento e maturação dos sistemas ósseo e orgânico, e que ainda ocorreriam no período pós-natal sem maiores conseqüências, se a cesárea não tivesse sido realizada<sup>5</sup>;
3. efeitos embriotóxicos que aumentam apenas em nível de dose claramente tóxica para organismo materno, ou seja, efeitos secundários. Geralmente, estes efeitos causados indiretamente pela toxicidade materna são considerados de menor significado biológico quando comparado à indução efeitos embriofetais em níveis de dose que não são tóxicas para a mãe (efeito direto).

---

<sup>4</sup> Para a avaliação do grau de severidade da ocorrência, é necessário dispor de um controle histórico da frequência espontânea das alterações em animais não tratados, da mesma cepa utilizada no laboratório.

<sup>5</sup> Variações, que por vezes são alterações geralmente reversíveis, ocorrem com frequência alta em grupos controles e tratados, e são caracterizadas por não apresentarem riscos à vida e por envolverem alterações estruturais de menor significado funcional

Levando-se em conta as considerações anteriores e os resultados de nosso estudo, pode-se dizer que os achados relacionados à exposição pré-natal à beta-ionona poderiam ser classificados principalmente como variações ou malformações menores.

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Gomes-Carneiro et al. (2003), que demonstram que, além de não induzir malformações grosseiras, a beta-ionona em doses < 1000mg/kg apresenta ação protetora quando administrada concomitantemente com a ciclofosfamida a ratas Wistar grávidas. Segundo Gomes-Carneiro et al. (2003), o tratamento concomitante com beta-ionona atenuou os efeitos embriofetais e teratogênicos da ciclofosfamida, quando esta foi administrada em dose única no dia 11 de gestação, dia em que ocorre o fechamento do tubo neural. Acredita-se que tal efeito se dê porque a beta-ionona inibe as reações catalisadas por enzimas hepáticas CYP2B1, necessárias a metabolização da ciclofosfamida, e consequentemente a produção de metabólitos citotóxicos e teratogênicos.

Em síntese, as alterações cuja frequência foi maior nos fetos expostos à beta-ionona parecem ser de menor gravidade, constituindo principalmente variações e não malformações propriamente ditas. O aumento apenas da frequência de variações e malformações menores, e os achados de estudos anteriores sugerem que, embora claramente tóxica para o organismo materno, a maior dose de beta-ionona não é teratogênica.

### **5.3 Considerações finais**

A toxicidade reprodutiva de compostos terpenóides, como o beta-mirceno, o alfa-terpineno e o citral, foi relatada em alguns artigos científicos (Paumgarten et al. 1998; Delgado et al., 1993a; Delgado et al. 1993b; Nogueira et al., 1995 e Araújo et al., 1996). A avaliação destes compostos foi realizada através do protocolo de três segmentos, tal como preconizado pelas diretrizes do FDA (1997 e 2001) e OECD (1995). Alguns autores avaliaram a toxicidade peri- e pós-natal (Delgado et al., 1993b) e os efeitos sobre a fertilidade e desempenho reprodutivo geral (Paumgarten

et al., 1998). Outros estudos, assim como o este, avaliaram especificamente o potencial embriotóxico dos monoterpenos citados acima (Delgado et al., 1993a; Nogueira et al., 1995 Araújo et al., 1996). Um resumo dos resultados obtidos nestes estudos encontra-se na Tabela 8.

**Tabela 8:** Análise comparativa dos resultados de estudos de embriotoxicidade de terpenóides em ratos.

	<b>NOAEL</b> (mg/kg de peso corpóreo)	Níveis de dose estudados (mg/kg de peso corpóreo)	Fonte
Beta-mirceno	500	0; 250; 500 e 1200	Delgado et al., 1993a
Citral	60	0; 60; 125; 250; 500 e 1000	Nogueira et al., 1995
Alfa-terpineno	30	0; 30; 60; 125 e 250	Araújo et al., 1996
Beta-ionona	500	0; 125; 250; 500 e 1000	Presente estudo

Todos os estudos foram conduzidos em ratos Wistar, com tratamento por via oral entre os dia 6 e 15 de gestação. O *NOAEL* diz respeito a embriotoxicidade.

Nenhum dos terpenóides estudados até o momento foi teratogênico. Enquanto o citral e a o alfa-terpineno exibiram efeitos embriotóxicos em níveis de dose mais baixos, o beta-mirceno teve ação comparável à da beta-ionona.

É importante, no entanto, destacar que o estudo da Toxicidade Reprodutiva de agentes químicos é uma das áreas mais complexas da Toxicologia Preditiva, e que em nossa investigação, somente um período restrito deste processo, *i.e.* o desenvolvimento embriofetal, foi avaliado.

Pequenas modificações no esquema de tratamento podem representar alterações significativas na severidade e no tipo de efeito observado. Como por exemplo, o próprio efeito embriofetal induzido pela beta-ionona após administração em dose única, ou após exposição continuada durante toda a fase de embriogênese. Outro exemplo é o tipo de efeito induzido pelo beta-mirceno após tratamento durante a embriogênese (*i.e.* dia 6 a 15 de gestação, *NOAEL*: 500mg/kg) ou expandido da embriogênese até o período de amadurecimento fetal (*i.e.* dia 6 a 21 de gestação;

*NOAEL*: 250mg/kg). Nesta última situação o *NOAEL* fixado foi bem inferior (Delgado et al., 1993b), indicando maior suscetibilidade ao beta-mirceno no final da gestação. Tal fato se deu porque o beta-mirceno interfere fortemente com o processo de trabalho de parto. Esta característica não é identificada em estudos de segmento II, como este, em que as fêmeas grávidas são – via de regra - submetidas à cesárea.

## 6. CONCLUSÕES

---

Os resultados deste estudo indicam que a beta-ionona foi tóxica para o organismo materno na dose de 1000mg/kg de peso corporal, como pode ser visto pela redução no ganho de peso das mães e pelo aparecimento de sinais clínicos de toxicidade durante o período do tratamento. Neste nível de dose, a beta-ionona também afetou adversamente o desenvolvimento embriofetal de ratos, causando embriofetividade, evidenciada pelo aumento de perdas pré- e/ou peri-implantação e pelo discreto aumento na proporção de reabsorções por implantações. Ainda em relação ao efeito embriofetal observado neste estudo, pode-se dizer que as fêmeas foram mais suscetíveis do que os machos.

No presente estudo, não foram encontrados indícios de retardo do crescimento intra-uterino induzido pela exposição *in utero* à beta-ionona, em nenhum dos níveis de dose estudados.

Os dados aqui apresentados indicam ainda que a beta-ionona não é teratogênica em ratos, uma vez que não houve aumento da frequência de malformações viscerais e/ou esqueléticas grosseiras em consequência da exposição *in utero* a este composto. Nestas condições experimentais, o nível máximo de dose em que não são observados efeitos adversos pode ser fixado em 500 mg de beta-ionona/kg de peso corporal, *i.e.* *NOAEL*=500 mg de beta-ionona/kg.

## 7. BIBLIOGRAFIA

---

- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (org.), 2002. *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 388p.
- ARAÚJO, I.B., SOUZA, C.A.M.; DE-CARVALHO, R.R.; KURIYAMA, S.N.; RODRIGUES, R.P.; VOLLMER, R.S.; ALVES, E.N.; & PAUMGARTTEN, F.J.R., 1996. Study of the embryofetotoxicity of  $\alpha$ -terpineno in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 34: 477-482.
- ASHLEY, M.F., 1962. *Prenatal Influences*.  
<<http://teratology.org/members/JMFpresentation/tsld014.htm>>
- BANTHORPE, D.V., 1994. Terpenóides. In: *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance* (Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs, J.B., Banthorpe, D.V., Harborne, J.B.), pp. 289-359, Harlow, UK: Longman Scientific & Technical, Longman Group.
- BREITMAIER, E., 1990. *Terpene*. Stuttgart: Teubner.
- BRYDON, P.; SMITH, T.; PROFFITT, M.; GEE, H.; HOLDER, R.; DUNNE, F., 2000. Pregnancy outcome in women with type 2 diabetes mellitus needs to be addressed. *International Journal of Perinatology*, 9: 87-93.
- *BURKE'S BACKYARD ARCHIVES*, 2001. Grafting Boronias, Março de 2005.  
<[http://burkesbackyard.com.au/archives/2001\\_archives/](http://burkesbackyard.com.au/archives/2001_archives/)>
- CHAHOUD, I; KURIYAMA, S; PAUMGARTTEN, F.J.R., 2002. Maternal protein-and-energy restriction reduces the developmental toxicity of cyclophosphamide and hydroxyurea in rats. *Toxicology*, 179(1-2):137-49.



- CHAHOUD, I.; LIGENSA, A.; DIETZEL, L. & FAQI, A.S., 1999. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reproductive Toxicology*, 13:375-381.
- CHAHOUD, I. & KWASIGROCH, T. E., 1977. Controlled breeding of laboratory animals. In: *Methods in Prenatal Toxicology* (Neubert, D.; Merker, H. J. & Kwasigroch, T. E.), Stuttgart: Georg Thieme Publishers, 78-91.
- CHAHOUD, I. & PAUMGARTTEN, F.J., 2005. Between fetal body weight of Wistar rats at term and the extent of skeletal ossification. *Braz J Med Biol Res.*, 38(4):565-75.
- CHERNOFF N.; MILLER, D.B.; ROSEN, M.B.; MATTSHECK, C.L., 1988. Developmental effects of maternal stress in the CD1 mouse by restraint on single days during the period of major organogenesis. *Toxicology*, 51:57-65.
- CHERNOFF, N.; ROGERS, J.M.; KAVLOCK, R.J., 1989. An overview of maternal and prenatal development: considerations for developmental toxicity hazard assessments. *Toxicology*, 59:111-125.
- CLINTON, S.K.; EMENHISER, C.; SCHWARTZ, S.J.; BOSTWICK, D.G.; WILLIAMS, A.W.; MOORE, B.J. & ERDMAN, J.W. Jr., 1996. cis-trans lycopene isomers, carotenoids and retinal in the human prostate. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 5(10): 853-33.
- COLLINS, T.F.X.; SPRANDO, R.L.; SHACKELFORD, M.E.; HANSEN, D.K.; WELSH, J.J., 1999. Food and Drug Administration proposed guidelines for reproduction studies. *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 30: 29-38.
- DAWSON, A.B., 1926. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S. *Stain Technology*, 1:123-124.

- DELGADO, I.F.; DE-CARVALHO, R.R.; NOGUEIRA, A.C.M.A.; MATTOS, A.P.; FIGUEIREDO, L.H.; OLIVEIRA, S.H.P.; CHAHOUD, I. & PAUMGARTTEN, F.J.R., 1993(a). Study on embryofetotoxicity of  $\alpha$ -myrceno in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 31:31-35.
- DELGADO, I.F.; NOGUEIRA, A.C.; SOUZA, C.A.; COSTA, A.M.; FIGUEIREDO, L.H.; MATTOS, A.P.; CHAHOUD, I. & PAUMGARTTEN FJ., 1993(b). Peri- and postnatal developmental toxicity of beta-myrcene in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 31(9):623-8.
- DURNEV, A.D.; TIJURINA, L.S.; GUSEVA, N.V.; ORESHCHENKO, A.V.; VOLGAREVA, G.M. & SEREDENIN, S.B., 1998. The influence of two carotenoid food dyes on clastogenic activities of cyclophosphamide and dioxidine in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 1-5.
- EDWARDS, M.J.; SHIOTA, K.; SMITH, M.S.; WALSH, D.A., 1995. Hyperthermia and birth defects. *Reproductive Toxicology*, 9(5):411.
- ERICKSON, R.E., 1976. The industrial importance of monoterpenes and essential oils. *Lloydia*, 39:8-19.
- FDA (Food and Drug Administration), 1997. *Guidance for industry*. CDER (Center for Drug Evaluation and Research). <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>
- FDA (Food and Drug Administration), 2001. *Reviewer Guidance. Integration of study results to assess concerns about human reproductive and developmental toxicities*. CDER (Center for Drug Evaluation and Research).

- FERREIRA, V.; LÓPES, R.; AZNAR, M., 2001. Olfactometry and Aroma Extract Dilution Analysis of Wines. In: *Analysis of Taste and Aroma*, J. Jackson, pp. 89-122. Berlin: Springer Verlag.
  
- GOMES-CARNEIRO, M.R.; DE-OLIVEIRA, A.C.A.X.; DE-CARVALHO, R.R.; ARAUJO, I.B.; SOUZA, C.A.M.; KURIYAMA, F.J.R.; PAUMGARTTEN, F.J.R., 2003. Inhibition of cyclophosphamide-induced teratogenesis by beta-ionone. *Toxicology*, 138:205-213.
  
- GOLDING-LANG, P.; KREUSER, E.D.; ZUNFT, H.J., 1996. Basis and consequences of primary and secondary prevention of gastrointestinal tumors. Recent Results. *Cancer. Res.*, 142:163-92.
  
- GREGG, N.M., 1941. Congenital caract following German measles in the mother. *Trans Ophthalmol Soc Aust*, 3:35-46.
  
- HALE, F., 1935. The relation of vitamin A to anophthalmos in pigs. *Amer. J. Ophtal*, 18:1087.
  
- HINDS, T.S.; WEST, W.L. & KNIGHT, E.M., 1997. Carotenoids and retinoids: a review of research, clinical and public health applications. *Journal of Clinical Pharmacology*, 37: 551-558.
  
- KHERA, K.S., 1984. Maternal toxicity: a possible factor in fetal malformations in mice. *Teratology*, 29:411-416.
  
- KHERA, K.S., 1985. Maternal toxicity: a possible etiologic factor in embryo fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratology*, 31:129-136.

- KOO, L.C., 1997. Diet and lung cancer 20+ years later: more questions than answers? *International Journal of Cancer*, 10 (Suppl): 22-29.
  
- KURIYAMA, S.N., 2000. *Desnutrição Materna e Embriotoxicidade de Xenobióticos: Estudos Experimentais em Ratos*. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade Estadual do Rio de Janeiro.
  
- LANGERON, M., 1934. *Précis de Microscopie*. Paris: Masson et cie.
  
- LARSEN, J.W., 1986. *Teratogen Update: Environmentally Induced Birth Defect Risks*, ed. J.L. Sever and R.L. Brent. New York: Alan R. Liss, Inc.
  
- LEFFINGWELL & ASSOCIATES, 2005. Aroma from carotenoids – Rose. <<http://www.leffingwell.com/rose.htm>>
  
- LEMONICA, I.P., 2003. Embriofetotoxicidade. In: *Fundamentos de Toxicologia* (OGA, Z.), pp. 91-99, 2. Ed., São Paulo: Atheneu Editora.
  
- LEONE, V.G., 1977. Comparative aspects of developmental stages in mammals used for teratogenic test. In: *Methods in Prenatal Toxicology*. George Thieme Publishers, Stuttgart, p. 14-24.
  
- MANETTA, A.; SCHUBBERT, T.; CHAPMAN, J.; SCHELL, M.J.; PENG, Y.M.; LIAO, S.Y. & MEYSKENS, F.J. Jr., 1996. Beta-carotene treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a phase II study. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 5(11): 929-32.
  
- MANSON, J.M., 1986. Teratogens. In: *Casarett and Doull's. Toxicology. The Basic Science of Poison*. (Klassen, C.D., Amdur, M.O. & Doull, J.) p195-220, New York, Toronto, London: Macmillan Publishing Company.

- MAYNE, S.T., 1996. Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB Journal*, 10: 690-701.
  
- MENARY, R.C. & MaCTAVISH, H.S., 2000. *Boronia Extracts – Increasing Yield and Quality*. A Report for the Rural Industries Research and development Corporation. University of Tasmania. Rural Industries Research & Development Corporation.
  
- MOORE, K. & PERSAUD, T., 1993. *The Developing Human*. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
  
- MURRAY, F.J.; JOHN, J.A.; BALMER, M.F. & SCHWETZ, B.A., 1978. Evaluation of styrene given to rats and rabbits by inhalation or by gavage. *Toxicology*, 11(4):335-43.
  
- NODA, T.; YAMANO, T. & SHIMIZU, M., 2001. Effects of maternal age on teratogenicity of di-n-butyltin diacetate in rats. *Toxicology*, 167: 181-189.
  
- NOGUEIRA, A.C.M.A.; CARVALHO, R.R.; SOUZA, C.A.M.; CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN, F.J.R., 1995. Study on the embryofeto-toxicity of citral in the rat. *Toxicology*, 96: 105-113.
  
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 1995. *Guideline for testing of chemicals*. Adopted by the Council on 27<sup>th</sup> July.
  
- PAULUS, W.E., 1999. Pharmacotherapy in pregnancy. *Ther Umsch*, 56(10):602-7.
  
- PAUMGARTTEN, F.J.; DE-CARVALHO, R.R.; SOUZA, C.A.; MADI, K.; CHAHOUD, I., 1998. Study of the effects of beta-myrcene on rat fertility and general reproductive performance. *Braz J Med Biol Res*, 31(7):955-65.

- PERSAUD, T.V.N., 1979. Teratogenesis – Experimental Aspects and Clinical Implications. In: *Experimentelle Pathologie* (Experimental Patology, Supplement 4). Gustav Fischer Verlag, Jena.
  
- RANGAHAU, M.K., 2001. *Boronia megastigma*. *New Zealand Institute for Crop & Food Research Ltd.*, number 4.
  
- ROGERS, J.M. & KAVLOCK, R.J., 2001. Developmental Toxicology. In: *Toxicology: The Basic Science of Poisons* (CASARETT and DOULL`S) p.351-381, New York, Editado por Klaassen, C.D., Amdur, M.O. & Doull, J.
  
- SALEWSKI, E., 1964. Faerbemethoden zum makroskopischen Nachweis von implantationsstellen am uterus der ratte. Naunyn-schmiedebergs. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 247:367.
  
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. (Orgs.), 2003. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre - Florianópolis: 5ªedição. Ed. Universidade/UFRGS /Ed. da UFSC.
  
- STEINEGGER, E. & HÄNSEL, R., 1992. *Pharmakognosie*. 5. ed. Berlin: Springer.
  
- STERZ, H., 1977. Routine examination of rat and rabbit fetuses for malformations of internal organs: combination of Baarrow’s and Wilson’ methods. In *Methods in Prenatal Toxicology*. (Neubert, H.J. Merker and T.E. Kwasigroch), pp.113-122, Stuttgart: Georg Thieme Publishers.
  
- STICHER, O., 1977. Plant mono-, di- and sesquiterpenoids activity. *In Life Sciences – New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutic activity*, ed. By Wagner, H. and Wolff, P., Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York, p. 137-176.

- TISSERAND, R. & BALACS, T., 1995. *Essential oil safety*. A guide for health care professionals. New York: Churchill Livingstone.
  
- TSUDA, H.; IWAHORI, Y.; ASAMOTO, M.; BABA-TORIYAMA, H.; HORI, T.; KIM, D.J.; UEHARA, N.; IIGO, M.; TAKASUKA, N.; MURAKOSHI, M.; NISHINO, H.; KAKIZOE, T.; ARAKI, E. & YAZAWA, K., 1996. Demonstration of organotropic effects of chemopreventive agents in multiorgan carcinogenesis models. *IARC. Sci. Publ.*
  
- WAGNER, H., 1993. *Pharmazeutische Biologie 2, Drogen und ihre Inhaltsstoffe*. 5. ed. New York: G. Fischer.
  
- WARKANY, J. & NELSON, R.C., 1941. Skeletal abnormalities in offspring of rats reared on deficient diets. *Anat. Rec.*, 79:83.
  
- WARKANY, J., 1977. History of Teratology. In: *Handbook of Teratology* (Wilson J.G. & Fraser F.C.), v1, p3-46. New York: Editora Plenum Press.
  
- WISE, L.D.; BECK, S.L.; BELTRAME, D.; BEYER, B.K.; CHAHOUD, I.; CLARK, R.L.; CLARK, R.; DRUGA, A.M.; FEUSTON, M.H.; GUITTIN, P.; HENWOOD, S.M.; KIMMEL, C.A.; LINDSTROM, P.; PALMER, A.K.; PETRERE, J.A.; SOLOMON, H.M.; YASUDA, M.; YORK, R.G., 1997. Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1). *Teratology*, 55:249-292.