



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CLARICE FLEXA DA ROCHA

**Estudo do extrato hidroetanólico de *Acmella oleracea* (L.) R. K.
Jansen sobre a função reprodutiva de ratos wistar adultos**

Macapá
2018

CLARICE FLEXA DA ROCHA

**Estudo do extrato hidroetanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.
K. Jansen sobre a função reprodutiva de ratos wistar adultos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Clarissa Silva Lima
Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos Tavares

**Macapá
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Bibliotecária: Thalita Ferreira (CRB2 – 1557)

615.19

R672e Rocha, Clarice Flexa da

Estudo do extrato hidroetanólico de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen sobre a função reprodutiva de ratos wistar adultos / Clarice Flexa da Rocha ; orientador, Clarissa Silva Lima. – Macapá, 2018. 113 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Acmella oleracea* (L) R. K. Jansen. 2. Jambú. 3. Distúrbios sexuais. 4. Libido. I. Lima, Clarissa Silva, orientador. II. Carvalho, José Carlos Tavares, co-orientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluna: Clarice Flexa da Rocha

Orientador(a): Profa. Dra. Clarissa Silva Lima

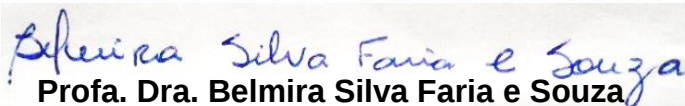
Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos Tavares



Profa. Dra. Clarissa Silva Lima

Presidente

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-PPGCF



Profa. Dra. Belmira Silva Faria e Souza

Membro Titular

Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá-IEPA.



Profa. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida

Membro Titular

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-PPGCF

Data: 01/02/2018

Dedico esta dissertação a toda minha família, em especial às quatro rosas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho de dissertação envolveu apoio humano, animal e material, concedidos por várias pessoas, de fundamental importância para a execução. Embora se trate de um trabalho individual, gostaria de expressar o meu reconhecimento e agradecimento a todos aqueles que me ajudaram ao longo deste trabalho:

À Deus sobre todas as coisas;

Aos meus pais, Cleonice Flexa e Antonio Rocha, por todo cuidado, carinho durante esses 24 anos de minha existência, a quem eu devo muito e nunca poderei pagar o amor infinito que me dão;

Às minhas irmãs, Nilcicley, Larissa e Alice, por todo estímulo e apoio que mesmo distantes fisicamente, se fizeram diariamente presentes na minha vida, eu amo vocês e tudo sempre será por vocês;

Ao Lawrence Raphael por todo apoio, carinho, amor, paciência, incentivo compreensão e abdições neste período, por acreditar e nunca me deixar desanimar;

À Zaide dos Anjos, uma grande mulher, que sempre me apoio, encorajou e por sempre está disposta a ouvir minhas novidades, tristezas e alegrias;

À profa. Dra. Clarissa Silva Lima pela orientação, paciência, disponibilidade, dedicação, contribuição à minha formação e por tudo o que me ensinou ao longo destes anos. Em termos pessoais posso dizer que foi um grande privilégio poder trabalhar diariamente e ao longo destes anos com uma pessoa extremamente inteligente, exigente a quem serei eternamente grata;

Ao Prof. Dr. Tit., Jose Carlos Tavares, por ter disponibilizado alguns recursos matérias para a realização do trabalho experimental, pelos comentários, disponibilidade e ensinamentos, sempre valiosos transmitidos durante esses mais de sete anos;

Ao grande amigo Jonas Lobato, um irmão, companheiro, um homem de caráter e coração maravilhoso;

Ao Prof. Dr. Irlon Maciel do Laboratório de Biocatálise e Biotransformação, pela ajuda e contribuições na caracterização química do extrato;

À Universidade Federal do Amapá, pela oportunidade criada através do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

A todos os professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, com grande carinho à profa. Dra. Lorane Melim, por toda ajuda, conselho e auxílio quando precisei. Ao Edson, que com grande paciência, dedicação ao seu trabalho, me aturou neste tempo de pós-graduação;

À toda família Fármacos, em especial a Karyny Roberta e Heitor Silva pela verdadeira amizade, pelo sério e divertido convívio diário, pelo companheirismo em todos os meus desafios profissionais e pessoais, e por tantas outras coisas. A vocês, meu sincero respeito;

Ao Helison Carvalho, pela amizade firmada desde a graduação e pelo apoio técnico-científico;

Igor Victor pela ajuda na histologia;

Rosângela Sarquis pela ajuda na identificação da espécie;

Aos colegas de laboratório de Toxicologia Reprodutiva pelos momentos de descontração em especial Rodrigo Costa pelas horas em experimento, bancadas e comprometimento em todo processo deste trabalho, e a Letícia pelo companheirismo e carinho nesse pouco tempo de convívio.

Aos colegas de turma, pelos conhecimentos trocados, informações repassadas, pelo estímulo em cada disciplina e principalmente pelo companheirismo;

Ao mestrando Iury Medeiros por fazer parte deste trabalho;

Á Fundação de Amparo à Pesquisa no Amapá pelo apoio financeiro concedido através da atribuição de uma bolsa de Mestrado da CAPES.

A todas as pessoas não mencionadas e que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO.....	24
1.2	SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	26
1.2.1	Espermatogênese.....	27
1.2.2	Regulação hormonal masculina.....	28
1.2.3	Atividade sexual masculina.....	29
1.3	SISTEMA REPRODUTOR FEMININO.....	31
1.3.1	Regulação hormonal feminina.....	32
1.3.2	Atividade sexual feminina.....	33
1.4	INTERAÇÃO SEXUAL- CICLO DE COPULAÇÃO DE RATOS.....	35
1.5	PLANTAS MEDICINAIS E REPRODUÇÃO.....	36
1.6	<i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen.....	42
1.6.1	Composição química.....	43
1.6.2	Propriedades farmacológicas de <i>A. oleracea</i>.....	44
1.6.2.1	Anestésico.....	44
1.6.2.2	Acaricida.....	45
1.6.2.3	Inseticida e larvicida.....	45
1.6.2.4	Antipirético.....	45
1.6.2.5	Anti-inflamatória e analgésica.....	45
1.6.2.6	Antifúngica.....	46
1.6.2.7	Diurética.....	46
1.6.2.8	Antioxidante.....	47
1.6.2.9	Afrodisíaca.....	47
1.6.2.10	Antimicrobiana.....	48
1.6.2.11	Antitumoral.....	48
1.6.2.12	Gastroproteção.....	48
1.6.2.13	Arritmogênico.....	48
1.6.2.14	Antirrugas.....	49
1.6.2.15	Promotor de absorção.....	49
1.6.3	Propriedades toxicológicas de <i>A. oleracea</i>.....	49

2	OBJETIVOS.....	50
2.1	OBJETIVO GERAL.....	50
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1	LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	51
3.2	MATERIAL BOTÂNICO.....	51
3.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	51
3.4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO: AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE ESPILANTOL.....	51
3.4.1	Cromatografia gasosa - Espectrometria de massas (CG-EM).....	51
3.5	PROTOCOLO ANIMAL.....	52
3.5.1	Descrição dos animais.....	52
3.5.2	Avaliação ética.....	52
3.6	ESTUDO DO USO DE EHAo EM FÊMEAS.....	53
3.6.1	Determinação do ciclo estral por lavado vaginal.....	53
3.6.2	Sinais de toxicidade.....	54
3.6.3	Avaliação da massa ponderal.....	54
3.6.4	Avaliação do consumo de água e ração.....	55
3.6.5	Acasalamento sincronizado.....	55
3.6.6	Coleta de sangue.....	55
3.6.6.1	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	56
3.6.6.2	Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	56
3.6.7	Avaliação do desempenho reprodutivo.....	56
3.6.8	Análise macroscópica, microscópica e peso relativo dos órgãos.....	57
3.6.8.1	Análise macroscópica dos órgãos.....	57
3.6.8.2	Peso relativo dos órgãos.....	57
3.6.8.3	Análise microscópica dos ovários.....	57
3.7	ESTUDO DO USO DO EHAo EM MACHOS	58
3.7.1	Avaliação da massa ponderal.....	58
3.7.2	Avaliação do consumo de água e ração.....	58
3.7.3	Sinais de toxicidade.....	58
3.7.4	Avaliação de parâmetros sexuais.....	59
3.7.4.1	Teste de motivação sexual.....	59
3.7.4.2	Teste de ereção peniana.....	60

3.7.4.3	Teste de comportamento sexual.....	61
3.7.4.3.1	Variáveis reprodutivas das fêmeas acasaladas.....	61
3.7.5	Dosagens hormonais.....	62
3.7.6	Análise macroscópica e massa relativo dos órgãos.....	62
3.7.6.1	Análise macroscópica dos órgãos.....	62
3.7.6.2	Análise da massa relativa dos órgãos.....	62
3.7.7	Avaliação funcional dos espermatozoides.....	63
3.7.7.1	Coleta do sêmen.....	63
3.7.7.2	Motilidade espermática.....	63
3.7.7.3	Concentração espermática.....	63
3.7.7.4	Morfologia espermática.....	64
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1	ANÁLISE DO EXTRATO.....	66
4.1.1	Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas (CG-EM).....	66
4.2	ESTUDO DO USO DE EHAo EM FÊMEAS.....	67
4.2.1	Sinais gerais de toxicidade.....	67
4.2.2	Avaliação do ciclo estral.....	67
4.2.3	Evolução ponderal, consumo de água e ração.....	69
4.2.4	Índices de fertilidade e acasalamento.....	71
4.2.5	Parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	73
4.2.6	Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos.....	75
4.2.7	Microscopia dos ovários.....	76
4.3	ESTUDO DO USO DE EHAo EM MACHOS.....	78
4.3.1	Sinais gerais de toxicidade.....	78
4.3.2	Avaliação da massa ponderal, consumo de água e ração.....	78
4.3.3	Avaliação de parâmetros sexuais.....	80
4.3.3.1	Teste de motivação sexual.....	80
4.3.3.2	Teste de ereção peniana.....	81
4.3.3.3	Teste de comportamento sexual.....	82
4.3.4	Teste de dominância letal.....	83
4.3.4.1	Variáveis reprodutivas.....	83
4.3.5	Dosagens hormonais.....	85
4.3.6	Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos vitais e reprodutores.....	86

4.3.7	Função espermática.....	87
4.3.7.1	Concentração, motilidade e morfologia espermática.....	87
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
	REFERÊNCIAS.....	91
	ANEXO 1 - Parecer do Comitê de Ética.....	111
	ANEXO 2 - Artigo publicado no Journal of Ethnopharmacology.	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fases da reprodução de mamíferos.....	24
Figura 2-	Sistema reprodutor feminino de <i>Rattus norvegicus</i> Wistar.....	31
Figura 3-	Reconhecimento pelo liberação de feromônios na região anogenital.....	34
Figura 4-	Atratividade (a), proximidade (a) e receptividade (c) no ciclo copulatório.....	35
Figura 5-	<i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen.....	43
Figura 6-	Fotografia da caixa de experimentação utilizada para a realização dos testes de parâmetros sexuais.....	59
Figura 7-	Cromatograma (A) e Espectro de Massas (B) referente ao extrato hidroetanólico das flores de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen.....	66
Figura 8-	Fêmea apresentando excessiva salivagem após o tratamento com EHAo.....	67
Figura 9-	Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de <i>A. oleracea</i> (G2 e G3), sobre o ciclo estral de ratas, linhagem Wistar, antes (14 dias) (A) e durante tratamento no período pré-acasalamento (B) (14 dias). No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey, sendo $n=5$ /grupo, onde: ^a comparação entre G1 vs G2, ^b comparação entre o grupo G1 vs G3 e ^c comparação entre o grupo G2 vs G3.....	68
Figura 10-	Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de <i>A. oleracea</i> (G2 e G3), sobre a massa (g) de ratas, linhagem Wistar, tratadas durante o período pré-acasalamento (A) (14 dias) e durante o período pré-implantação (d0-d5) e após o tratamento (d13) (B). No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey, sendo $n=5$ /grupo.....	69
Figura 11-	Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de <i>A. oleracea</i> (G2 e G3), sobre o consumo de ração (g) de ratas, linhagem Wistar, tratadas durante o período pré-acasalamento (A) (14 dias) e	

durante o período pré-implantação (d0-d5) e após o tratamento (d13) (B). No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey, sendo $n=5$ /grupo, onde: ^a comparação entre G1 vs G2, ^b comparação entre o grupo G1 vs G3 e ^c comparação entre o grupo G2 vs G3..... 70

Figura 12- Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de *A. oleracea* (G2 e G3), sobre o consumo de água (mL) de ratas, linhagem Wistar, tratadas durante o período pré-acasalamento (A) (14 dias) e durante o período pré-implantação (d0-d5) e após o tratamento (d13) (B). No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey, sendo $n=5$ /grupo, onde: ^a comparação entre G1 vs G2, ^b comparação entre o grupo G1 vs G3, ^c comparação entre o grupo G2 vs G3..... 70

Figura 13- Em **A**: cesária de rata apresentando embriões nos cornos uterinos (seta), e em **B**: visualização dos embriões com 13 dias de desenvolvimento..... 73

Figura 14- Fotomicrografias de cortes histológico de ovários de ratas wistar em secção transversal, H.E. Nota-se: **a)** presença de folículo ovariano primordial (seta pequena), folículos em pleno desenvolvimento (#), presença de folículo antral em desenvolvimento (seta grande) e presença de corpo lúteo (CL) (G1-Grupo Controle) (100x). **b)** observar região bem preservada, com presença de corpo lúteo (CL) e folículo em desenvolvimento (#) (G1- Grupo Controle) (400x). **c)** na região cortical (seta dupla), observar a presença de folículos primordiais (setas), de folículos em desenvolvimento (#) e presença de corpo lúteo (CL) (G2- Grupo Tratado I, Dose 88,91) (100x). **d)** presença de folículo secundário ou antral bem desenvolvido (ovócito (O), *cumulus oophorus* (CO), corona radiada (seta), antro folicular (A)) e de folículos em desenvolvimento (#) (G2- Grupo Tratado I, Dose 88,91) (400x). **e)** observar região cortical e presença de folículos ovarianos primordiais (setas), de folículos em desenvolvimento (#), de folículo antral (FA) e presença de corpo lúteo (CL) (G3- Grupo Tratado II, Dose 444,57) (100x). **f)** presença de folículos em desenvolvimento (#) e observar corpo lúteo (CL) (G3- Grupo Tratado II,

	Dose 444,57) (400x).....	77
Figura 15-	Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de <i>A. oleracea</i> (G2 e G3), sobre o desenvolvimento (g) de ratos, linhagem Wistar, tratados durante 30 dias. No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey.....	78
Figura 16-	Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de <i>A. oleracea</i> (G2 e G3), sobre o consumo de água (mL) de ratos, linhagem Wistar, tratados durante 30 dias. No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey.....	79
Figura 17-	Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de <i>A. oleracea</i> (G2 e G3), sobre o consumo de ração (g) de ratos, linhagem Wistar, tratados durante 30 dias. No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey.....	79
Figura 18-	Em A filhote recém-nascido, apresentando-se sem pelos e orelhas dobradas e em B (a) pelos já nascidos, (b) orelhas desdobradas e (c) olhos ainda fechados.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado a partir das flores de <i>A. oleracea</i> (G2 e G3), sobre as variáveis reprodutivas de ratas com prenhes interrompida ao 13º dia de gestação.....	72
Tabela 2-	Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado a partir das flores de <i>A. oleracea</i> sobre o perfil bioquímico de ratas com prenhes interrompida ao 13º dia de gestação.....	74
Tabela 3-	Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado a partir das flores de <i>A. oleracea</i> sobre o perfil hematológico de ratas com prenhez interrompida ao 13º dia de gestação.....	75
Tabela 4-	Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado a partir das flores de <i>A. oleracea</i> sobre o peso relativo dos órgãos de ratas com prenhez interrompida ao 13º dia de gestação.....	76
Tabela 5-	Média $\pm$ D.P.M do tempo, em minutos (min) para cada um dos grupos do teste de motivação sexual observado durante 30 min em ratos machos tratados durante 30 dias com EHAo, preparado a partir das flores de <i>A. oleracea</i>	80
Tabela 6-	Média $\pm$ D.P.M para cada um dos grupos do teste de ereção peniana em ratos machos, observado durante 30 min, tratados com EHAo preparado a partir das flores de <i>A. oleracea</i>	81
Tabela 7-	Média $\pm$ D.P.M dos parâmetros comportamentais em minutos (min) de ratos machos tratados durante 30 dias com EHAo, preparado a partir das flores de <i>A. oleracea</i> , observados durante 30 minutos.....	82
Tabela 8-	Variáveis reprodutivas de progenitoras, acasaladas com os ratos machos, tratados durante 30 dias com EHAo, preparado a partir das flores de <i>A. oleracea</i>	84
Tabela 9-	Efeito do EHAo, preparado a partir das flores de <i>A. oleracea</i> , sobre os níveis hormonais de testosterona, hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) dos animais avaliados.....	85
Tabela 10-	Peso relativo de órgãos vitais e reprodutores de animais dos grupos controle (G1) e tratados (G2 e G3) com EHAo, preparado a partir	87

das flores de *A. oleracea*, durante 30 dias.....

Tabela 11-	Concentração e motilidade espermática de animais dos grupos controle (G1) e tratado (G2 e G3) com EHAo, preparado a partir das flores de <i>A. oleracea</i> , durante 30 dias.....	88
-------------------	--	----

Tabela 12-	Morfologia espermática de animais dos grupos controle (G1) e tratados (G2 e G3) com EHAo, preparado a partir das flores de <i>A. oleracea</i> , durante 30 dias.....	88
-------------------	--	----

Quadro 1-	Grupos experimentais para avaliar a performance reprodutiva de <i>Rattus norvegicus albinus</i> , linhagem Wistar, fêmeas, tratadas com o EHAo e água destilada.....	53
Quadro 2-	Identificação das fases do ciclo estral de ratas linhagem Wistar segundo Marcondes et al., (2012).....	54
Quadro 3-	Grupos experimentais para avaliar a performance reprodutiva de <i>Rattus norvegicus albinus</i> , linhagem Wistar, machos, tratados com o EHAo e água destilada.....	58
Quadro 4-	Marcha da coloração de Papanicolau de acordo com Kit NewProv®.....	64

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
A	Antro folicular
%	Porcentagem
ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
CEMIB	Centro Multidisciplinar para investigação Biológica na Área da Ciências em Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CL	Corpo lúteo
CO	<i>Cumulus oophorus</i>
D	Diestro
D.P.M	Desvio Padrão da média
E	Estro
EHAo	Extrato Hidroetanólico de <i>Acmella oleracea</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EXP	Experimento
FA	Folículo antral
FAL	Fosfatase alcalina

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Frequência de Ejaculação
FM	Frequência de montagem
FP	Frequência de Penetração
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
FSR	Fêmea sexualmente receptiva
g	Gramas
GGT	Gama Glutamil Transpeptidase
h	Horas
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IC50	Concentração inibitória máxima
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IEP	Índice de ereção peniana
IPEJ	Intervalo Pós-Ejaculatório
Kg	Quilogramas
L	Litro
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
LM	Latência de montagem
LP	Latência de Penetração
M	Metaestro
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MSA	Macho sexualmente ativo
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
ND	Tempo restante
O	Ovócitos
°C	Grau Celsius

OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
ON	Oxido nítrico
P	Proestro
r.p.m	Rotações por minuto
ML	Manipulr ou lamber a região genital
TMS	Teste motivação sexual
U/L	Unidade por litro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
v.o	Via oral
VCM	Volume globular médio
WHO	<i>World Health Organization</i>

Estudo do extrato hidroetanólico de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen sobre a função reprodutiva de ratos wistar adultos

Introdução: A espécie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Asteraceae), conhecida popularmente como jambú, possui várias atividades farmacológicas comprovadas e dados da literatura tem demonstrado sua eficácia em distúrbios sexuais. **Objetivos:** Avaliar os efeitos da administração oral do extrato hidroetanólico das flores de *A. oleracea*, nas doses de 88,91 mg/kg (G2) e 444,57 mg/kg (G3), sobre variáveis de toxicidade sistêmica e fertilidade de ratos linhagem Wistar. **Metodologia:** O extrato obtido foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e então utilizado nos ensaios biológicos. A avaliação iniciou aos 90 dias de vida para ambos os sexos e o período de tratamento foi para as fêmeas de 104 a 124 dias de vida e para os machos de 90 a 120 dias de vida. Foram realizadas, diariamente, mensurações do consumo de ração, ingestão hídrica e massa ponderal, avaliação do ciclo estral (fêmeas), comportamento sexual (machos), parâmetros reprodutivos, bioquímicos e hematológicos (fêmeas), hormonais (machos), espermáticos (machos) e histopatológicos (fêmeas). **Resultados e discussão:** A análise em cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa detectou o composto (2*E*,6*Z*,8*E*) -*N*-isobutyldeca-2,6,8-trienamida, como majoritário no extrato (84%). O extrato não provocou toxicidade nas fêmeas, e no ciclo estral, observou-se que a frequência das fases férteis aumentou, enquanto as fases não férteis apresentaram redução significativa nos animais tratados com o EHAo em relação ao controle. Houve aumento significativo do consumo hídrico ($p<0,01$), dos níveis de triglicérides, colesterol total e frações ($p<0,05$) e do percentual de neutrófilos ($p<0,05$). Nos machos, o tratamento não ocasionou toxicidade, melhorou o comportamento sexual e aumentou os níveis hormonais ($p<0,001$) em ambas as doses utilizadas. **Conclusão:** O tratamento com o EHAo é seguro nas concentrações e tempo de tratamento estudado, sendo capaz de influenciar o ciclo estral, sem alterar a foliculogênese em fêmeas e em machos aumenta a libido sem afeta a espermatogênese.

Palavras-Chave: libido; fertilidade; toxicologia.

Agradecimentos: CAPES/FAPEAP.

Study of the hydroethanolic extract of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen on the reproductive function of adult Wistar rats

Introduction: The species *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Asteraceae), known as jambú, has several established pharmacological activities and literature data demonstrate its efficacy in sexual disorders. **Objectives:** To evaluate the effects of oral administration of the hydroethanolic extract of *A. oleracea* flowers at doses of 88.91 mg / kg (G2) and 444.57 mg / kg (G3) on systemic toxicity and fertility on Wistar rats. **Methodology:** The extract obtained was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry and then used in biological assays. Evaluation was performed at 90 days of age for both sexes and the treatment period for females from 104 to 124 days of life and for males from 90 to 120 days of life. Measurements of feed intake, water intake and weight, estrous cycle (females), sexual behavior (males), reproductive parameters, biochemical and hematological (female), hormonal (male), sperm (male) and histopathological (females). **Results and discussion:** Gas chromatographic analysis detected (2E, 6Z, 8E) -N-isobutyldeca-2,6,8-trienamide as major compound of the extract (84%). The extract did not cause toxicity in females, and in estrous cycle it was observed that the frequency of the fertile phases increased, whereas the non-fertile phases showed a significant reduction in the animals treated with the EHAo in relation to the control. There was a significant increase in water intake ($p < 0.01$), triglyceride levels, total cholesterol and fractions ($p < 0.05$) and neutrophil percentage ($p < 0.05$). In males, treatment did not cause toxicity, improved sexual behavior and increased hormone levels ($p < 0.001$) at both doses. **Conclusion:** The treatment with EHAo is safe in the concentrations and time of treatment studied, being able to influence the estrous cycle, without altering the folliculogenesis in females and in males increases the libido without affecting the spermatogenesis.

Key-words: libido; fertility; toxicology.

Acknowledgements: CAPES/FAPEAP.

A espécie *Acemella oleracea* (L.) R. K. Jansen, conhecida popularmente como jambu, bastante cultivada e utilizada como tempero na culinária da região norte do Brasil (FAVORETO; GILBERT, 2010; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013). Possui como constituinte majoritário as alquilamidas, sendo o composto (2*E*,6*Z*,8*E*) - *N*-isobutyldeca-2,6,8-trienamide (espilantol), descrito como o responsável pelas atividades farmacológicas atribuídas a esta espécie, e é encontrado principalmente nas flores e folhas (JACOBSON, 1957; BOONEN et al., 2010; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013).

Dentre inúmeras atividades farmacológicas atribuídas a esta espécie, tem-se destacado seus efeitos sobre a resposta sexual, apresentados em estudos clínicos e não clínicos, que corrobora para sua possível utilização no tratamento de disfunções sexuais. Em mulheres, as disfunções sexuais são associados a declínio do desejo sexual, falta de libido e problemas para alcançar o orgasmo, em homens principalmente dificuldades para alcançar a ereção.

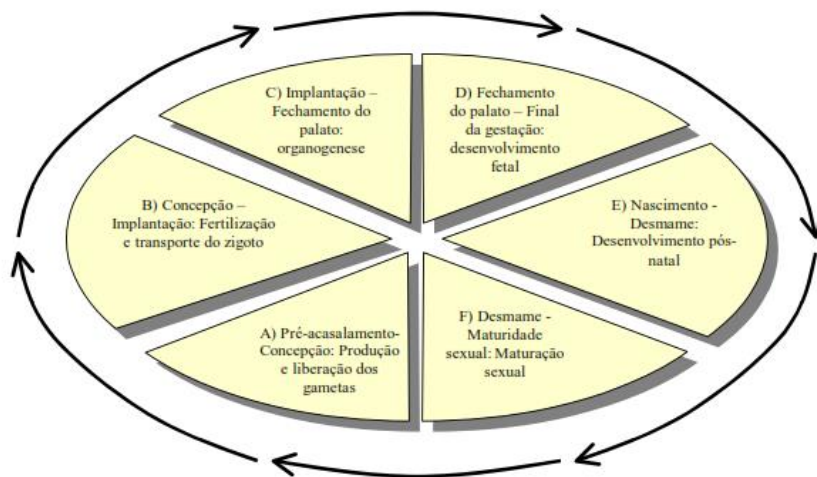
A utilização de plantas medicinais tem sido uma excelente fonte química para a descoberta de novos medicamentos atrelado ao aumento do número de homens e mulheres que buscam produtos naturais para melhorar a atividade sexual, seja por problemas funcionais ou pelo envelhecimento. Contudo, muitas destas espécies acabam interferindo na fecundação, implantação, fertilidade e morfologia dos órgãos reprodutores, sendo o caso de plantas como *Parkia clappertoniana*, *Carpolobia lutea*, *Ficus platyphylla* Del. Holl e *Pouzolzia mixta*.

A partir destas considerações propôs-se pesquisar o seguinte problema: A utilização do EHAo melhora a fertilidade e reprodução de machos e fêmeas da linhagem Wistar? Para isso, foi utilizado os guias de agências reguladoras internacionais como *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA) e *International Conference on Harmonisation* (ICH).

1.1 TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

Segundo Riecke e Stahlmann (2000), a reprodução nos mamíferos pode ser dividida em seis partes (**Figura 1**):

Figura 1- Fases da reprodução de mamíferos.



Fonte: Riecke; Stahlmann (2000).

- A) *Fase do pré-acasalamento até a concepção:* avaliação das funções reprodutivas em adultos de ambos os sexos, desenvolvimento, maturação dos gametas, comportamento no acasalamento e fertilidade;
- B) *Fase da concepção até a implantação:* avaliação das funções reprodutivas de fêmeas adultas, desenvolvimento pré-implantação e implantação;
- C) *Fase de implantação até o fechamento do palato:* avaliação das funções reprodutivas de fêmeas adultas, desenvolvimento embrionário e formação de órgãos principais;
- D) *Fase do fechamento do palato até o final da gestação:* avaliação das funções reprodutivas fêmeas adultas, crescimento, desenvolvimento fetal, e desenvolvimento dos órgãos;
- E) *Fase do nascimento até o desmame:* avaliação das funções reprodutivas de fêmeas adultas, adaptação neonatal a vida extrauterina, crescimento e desenvolvimento pré-desmame;
- F) *Fase do desmame até a maturidade sexual:* crescimento, desenvolvimento pós-desmame, adaptação a vida independente, e alcance da função sexual completa.

Pela toxicologia do desenvolvimento, cada uma das etapas citadas, deve ser estudada por testes específicos devido susceptibilidade a efeitos adversos em ambos os sexos (ICH, 2005; EMA, 2008). E os estudos mais utilizados para estas investigações no desenvolvimento em mamíferos, são os preconizados pela ANVISA e agências reguladoras internacionais (HOLENBACH et al., 2010).

No Brasil, em 2013 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou o “Guia para a Condução de Estudos Pré-clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos”, elaborado pela Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Esse documento contém as orientações para a condução de testes não clínicos de toxicologia do desenvolvimento, sendo embasado em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos dos Estados Unidos e outros países como a *Food and Drug Administration* (FDA), *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), *European Medicines Agency* (EMA) e pela *International Conference on Harmonization* (ICH), *National Cancer Institute* (NCI), *World Health Organization* (WHO) (KUMAR; MISHRA, 2011; BRASIL, 2013).

Os estudos são propostos em três seguimentos, o I conhecido também como estudo de fertilidade e reprodução, engloba estudos que avaliam efeitos sobre a fertilidade e o desempenho reprodutivo geral em ambos os sexos, compreendendo o período de pré-acasalamento até a implantação; o segmento II, também conhecido como toxicologia da teratologia, realiza estudos de embriofetotoxicidade ou teratogenicidade, e investiga especificamente os efeitos adversos sobre a organogênese. E o segmento III, estuda os efeitos adversos sobre o período perinatal, parto e desenvolvimento pós-natal (BASS, 2011; BRASIL, 2013).

No caso do seguimento I, está relacionada a vários efeitos que substâncias, medicamentos e princípios ativos provocam, alterando as funções dos órgãos reprodutores e endócrino, previamente ao acasalamento (machos e fêmeas), durante o acasalamento e durante a implantação embrionária (BRASIL, 2013).

E como descrito deve-se observar nas fêmeas o período fértil, implantação e desenvolvimento dos estágios embrionários de pré-implantação, desregulação do ciclo menstrual, e nos machos, a fase adulta para avaliação de efeitos funcionais que possam não ter sido detectados em exames histológicos do órgão reprodutor, como comportamento sexual, produção, maturação e transporte de gametas (KUNTZE et al., 2012; BRASIL, 2013; SFALSINI, 2013).

1.2 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

A maioria dos mamíferos, incluindo o rato, apresenta o aparelho reprodutor masculino constituído pelos testículos, epidídimos, ductos deferentes, glândulas acessórias (próstata e vesícula seminal) e pênis, e o conjunto destes órgãos são integrados pelo sistema endócrino e articulados para exercer a síntese de gametas e hormônios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

O testículo do rato contém aproximadamente 30 túbulos seminíferos, com 20 metros de comprimento, 250 µm de diâmetro externo, são alojados na bolsa escrotal, envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, denominada túnica albugínea (ROSS; PAWLINA, 2012). Os túbulos seminíferos são constituídos por uma membrana basal própria ou camada peritubular e pelo epitélio seminífero, composto por células de Sertoli e células germinativas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

As células de Sertoli são responsáveis ainda pela produção de vários metabolitos importantes para o controle das etapas de produção do espermatozoide (espermatogênese) (SPRITZER; REIS, 2012). Apresentam um período fixo de proliferação e maturação, sem mitose ou diferenciação após seu desenvolvimento. Portanto, alterações no número, estrutura ou função destas células, podem causar danos ao epitélio germinativo comprometendo a espermatogênese, pois, o número de células de Sertoli está relacionado ao tamanho testicular no indivíduo adulto e sua produção espermática (SPRITZER; REIS, 2012).

O espaço intertubular é preenchido por tecido conjuntivo e nervos, e apresentam células como fibroblastos, células indiferenciadas, células do sistema imune, como macrófagos, e as células de Leydig. As células de Leydig se desenvolvem ainda durante a fase fetal e se diferenciam no período pré-puberal, são responsáveis pela produção do hormônio testosterona e consequente masculinização do sistema urogenital (ROSS; PAWLINA, 2012).

O epidídimo é um ducto longo, extremamente enovelado, medindo de 4 a 6 m de comprimento no homem, circundado por uma camada de células musculares lisas, é dividido anatômica e histologicamente em: cabeça, com pouca concentração de espermatozoides na luz; corpo, com aumento na concentração de espermatozoides na luz do ducto e cauda, com grande quantidade de espermatozoides (OLIVEIRA et al., 2013).

Por tanto, uma das funções do epidídimo é o acúmulo e armazenamento de espermatozoides (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). É importante ressaltar que os espermatozoides adquirem motilidade e capacidade fértil durante sua passagem pelo

epidídimo e que a redução do tempo de travessia por este órgão prejudica o processo de maturação espermática (BORGES et al., 2013).

As glândulas acessórias constituídas por próstata, vesícula seminal e glândula bulbouretral auxiliam na formação do fluído seminal, gerando energia para a mobilidade, proteção, transporte, nutrição e estabilidade do espermatozoide (ROSS; PAWLINA, 2012). O pênis anatomicamente é composto por raiz, corpo e glândula, formado por tecido erétil, pela uretra e envolto por pele, apresentando como funções primárias: micção, copulação e transferência de espermatozoides (RODRIGUEZ et al., 2012).

1.2.1 Espermatogênese

A espermatogênese denominada de gametogênese masculina, é um processo contínuo na vida do homem após ser atingida a puberdade, em resultado à estimulação dos hormônios gonadotrópicos da hipófise anterior, iniciando em média aos 13 anos e prosseguindo durante maior parte da vida, diminuindo na velhice, ocorrendo aproximadamente durante 74 dias (GUYTON; HALL, 2012; HAMMOUD et al., 2012).

Inicialmente as espermatogonias formadas durante a vida fetal, alojadas nos túbulos seminíferos, migram entre as células de Sertoli, e após a fase de multiplicação entram na fase de crescimento, originando dois espermatócitos primários, que se dividem formando dois espermatócitos secundários. A continuidade do processo de maturação ocorre na divisão por meiose dos espermatócitos secundários, dando origem as espermátides, que passam pelo fenômeno da espermiogênese, formando assim, os gametas masculinos (ROMBAUT et al., 2017).

Os espermatozoides formados são compostos de cabeça e cauda, percorrem o epidídimo, onde após 18-24 horas desenvolvem a capacidade de motilidade, são armazenados em maior quantidade no canal deferente e em menor quantidade no epidídimo (HAMMOUD et al., 2012).

Na cabeça encontra-se o núcleo condensado da célula, com membrana plasmática e citoplasma. Na parte anterior da cabeça, encontra-se o acrossomo, formado principalmente pelo aparelho de Golgi e aglomerado de enzimas proteolíticas, entre elas a hialuronidase que possibilitam a entrada dos espermatozoides para o processo de fertilização (GUYTON; HALL, 2012). A cauda do espermatozoide é responsável pela motilidade da célula e possui três componentes: esqueleto central (constituído por 11 micro túbulos- coletivamente denominados de axorema); a membrana que recobre o

axorema; e o conjunto de mitocôndrias que envolve o axorema na porção proximal da cauda (CHEN et al., 2017).

Contudo é necessário que os espermatozoides depositados no trato genital feminino possuam viabilidade, fertilidade, morfologia e atividade metabólica normais, capacitação espermática e membrana plasmática íntegra, para que consiga atravessar o útero, passa para o oviduto e fertilizar o ovócito (ROMBAUT et al., 2017).

Por volta de 50 dias de idade, ratos atingem a puberdade, com 75 dias apresentam a máxima produção espermática testicular e com 100 dias possuem a maior concentração de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo, atingindo então a maturidade sexual. A espermatogênese completa tem duração de 52 a 53 dias (ROBB et al., 1978; CHEN et al., 2017).

1.2.2 Regulação hormonal masculina

O hipotálamo é um importante centro integrador de informações, que garante a homeostase do organismo, coordenação de funções viscerais, iniciação de comportamentos, como a reprodução e atua como área de interação entre o sistema nervoso central e o resto do corpo (GORE, 2013). Secrete o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que estimula a produção de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) pela hipófise anterior, representando a primeira etapa para o início da puberdade (MOURÃO; ABRAMOV, 2011; GUYTON; HALL, 2012).

O LH nos homens atua sobre as células de Leyding e estimula a produção de testosterona pelos testículos e o FSH liga-se a receptores específicos nas células de Sertoli, possibilitando o aumento da produção de várias proteínas, estimulando principalmente a espermatogênese (JUAREZ-ROJAS et al., 2017). Como exemplo destas proteínas, temos a “proteína ligadora de androgênio” (ABP), que tem como função ligar-se a testosterona e garantir altas concentrações locais deste hormônio, que em conjunto com o FSH atuam estimulando divisões meióticas necessárias para a espermatogênese (SURESH; RAJAN; TSUTSUMI, 2011).

Parte da testosterona circulante é secretada pelo testículo, menos de 1% é produzida pela glândula adrenal, e grande parte da testosterona circulante está ligada fracamente à albumina e mais fortemente a globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) (MADHUBABU; YENUGU, 2017). A testosterona pode ainda ser convertida a diidrotestosterona (DHT) pela ação da enzima 5 α -redutase, fazendo com que a DHT

tenha afinidade duas vezes maior pelo seu receptor quando comparado ao seu precursor (KICMAN, 2010).

A testosterona além de regular a concentração periférica de LH e atuar por sinergismo com o FSH na produção de espermatozoides, é responsável também pelo desenvolvimento do sistema reprodutor masculino e diferenciação sexual (JUAREZ-ROJAS et al., 2017). Portanto, sempre que a secreção de testosterona fica elevada, por meio do hipotálamo- hipófise anterior a testosterona fica à níveis desejáveis (*feedback negativo*), e do contrário, níveis baixos de testosterona induz o hipotálamo a secretar GnRH, estimulando aumento da secreção de LH e FSH, tendo como resultado o aumento da secreção testicular de testosterona (MADHUBABU; YENUGU, 2017).

Os hormônios gonadais, portanto, promovem a diferenciação sexual do sistema nervoso em dois momentos. Antes da puberdade, sendo um período crítico em que os circuitos neurais de cada sexo são consolidados, desempenham então uma função organizacional, e depois da puberdade, esses hormônios desempenham função regulatória, pois os hormônios atuam ativando os circuitos e desencadeando os aspectos fisiológicos da função reprodutora (GERARDIN et al., 2006).

1.2.3 Atividade sexual masculina

Com a puberdade há vários eventos dinâmicos e complexos do desenvolvimento sexual, acarretando mudanças físicas, comportamentais e hormonais, através das quais a maturação sexual ocorre e a capacidade reprodutiva é obtida (GOLUB et al., 2008). Vários neurotransmissores e hormônios modulam a atividade sexual, no entanto, o mecanismo de ação, sobre as fases do ciclo de resposta sexual ainda não são bem compreendidas (LA TORRE et al., 2013). Contudo, é importante distinguir a motivação sexual, do desempenho sexual, mesmo usualmente não sendo independentes um do outro.

A motivação sexual é ativada pela presença de um (a) companheiro (a), trata-se de uma motivação incentivada, diferente de outras motivações como sede, fome, sono, pois em curto prazo a abstinência não tende a ser prejudicial ao organismo (AGMO, 2003). Esta fase foi descrita por Kaplan em 1979, como a fase de desejo ou apetência. Corresponde à vontade de estabelecer uma relação sexual, a partir de algum estímulo sensorial, pela memória, sendo o Sistema Nervoso Central (SNC) o centro primário do controle da motivação sexual.

Machos em resposta aos estímulos de fêmeas receptivas, necessitam além das características auditivas, visuais e olfativas, de concentrações adequadas de hormônios testiculares (HULL; WOOD; MCKENNA, 2006; VANDENBERGH, 2006). Portanto, o contato sexual é iniciado pelo estímulo olfatório que parece estar envolvido na transmissão central de muitos feromônios (SAKUMA, 2009). O desempenho sexual por sua vez é um comportamento que envolve gratificação e reforço, composto por vários elementos, incluindo a investigação anogenital, montagens, intromissões e ejaculação (LA TORRE et al., 2013).

Contudo, a característica principal da resposta sexual masculina é a ereção peniana. A ereção consiste em complexas interações que envolve o sistema nervoso autônomo e fluxo sanguíneo local (AGMO, 1997). Inicialmente o pênis no estado de flacidez por ação da noradrenalina (vasoconstricção da musculatura lisa impedindo entrada de sangue nos corpos cavernosos), indo para o estado de ereção ação da acetilcolina (desaparecimento da vasoconstricção, com entrada de sangue e chegando-se à ereção) (WHO, 2010).

O óxido nítrico (ON) atualmente é considerado o principal modulador bioquímico da ereção peniana, atua ativando a enzima guanilato ciclase, que tem como função a síntese de guanosina monofosfato cíclica, está atua diminuindo o influxo de cálcio na musculatura vascular e no corpo cavernoso do pênis, induzindo o relaxamento muscular e possibilitando a ereção (CHOI; KIM; PARK, 2017).

Como descrito, a presença de ON no líquido seminal é fundamental para que os espermatozoides possam atuar na função de gameta. Porém em altas concentrações, o ON causa danos estruturas e reduz mobilidade e vitalidade dos espermatozoides. Do contrário, em baixas concentrações, ocasiona dificuldades no processo de fertilização, e tem-se o comprometimento da função reprodutora, por disfunção da regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (FANELLI et al., 2017).

Os homens, no entanto, estão vulneráveis a apresentar disfunções sexuais devido à ignorância, inibição e ansiedade de desempenho (COSTA, 2010). As principais disfunções que acometem os homens são: disfunção erétil (incapacidade de se obter e manter a ereção), disfunções da ejaculação (precoce, retardada, retrograda e ausente) e alterações espermáticas (viabilidade e morfologia) (CAVALCANTI; SERRANO; LOPES, 2005).

A ejaculação precoce ocorre quando o homem não consegue identificar e controlar as sensações proprioceptivas que antecedem o reflexo ejaculatório (KOCKOTT, 2007). A retardada é a dificuldade ou inabilidade de ejacular mesmo tendo estímulo,

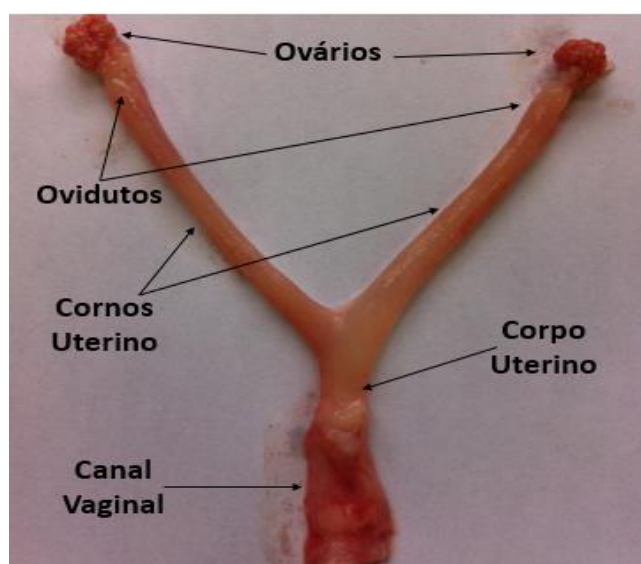
desejo e ereção (LEIBLUM; WIEGEL, 2002). A retrograda ocorre quando o sêmen é direcionado para a bexiga, ao invés de ser expulso (MUNJACK; KANNO, 1979). E a ausência de ejaculado ocorre em situações que não há produção de sêmen ou quando ocorre oclusão de canais que conduzem o líquido seminal do testículo ao pênis (CAVALCANTI; SERRANO; LOPES, 2005).

Na investigação de possíveis alterações no sistema reprodutor masculino, as avaliações consistem em testes de comportamento sexual, desempenho sexual, fertilidade e em avaliação laboratorial, principalmente de exame físico, dosagens dos níveis hormonais (testosterona livre e total, FSH, LH e prolactina) e análise seminal (HELLSTROM et al., 2006; WHO, 2010). Todavia, nenhum teste isolado é capaz de prever a fertilidade de um indivíduo, mas o conjunto de várias características pode determinar uma maior fertilidade em potencial (FANELLI et al., 2017).

1.3 SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

Consiste em dois ovários, duas tubas uterinas (ovidutos), útero, vagina e a genitália externa, que tem como função a produção e transporte dos gametas, síntese de hormônios, reprodução, proteção e nutrição do embrião (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011) (**Figura 2**).

Figura 2- Sistema reprodutor feminino de *Rattus norvegicus* Wistar.



Fonte: Autor (2017).

Os ovários são glândulas que possuem como funções principais a secreção dos hormônios esteroides sexuais e a formação, desenvolvimento e liberação dos

ovócitos (BAERWALD et al., 2012; MOLINA, 2014; LIU et al., 2015). Tem sua superfície recoberta por epitélio germinativo, o qual é apoiado pela túnica albugínea, e subjacente a túnica, observa-se a medula e a córtex, através da medula ocorre a entrada e saída dos sistemas vasculares, linfático e nervoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). E no córtex ocorre o desenvolvimento dos folículos ovarianos e produção dos hormônios ovarianos progesterona e estrógeno (BAERWALD et al., 2012).

As trompas de Falópio, como os ovários não são considerados sexualmente receptivas. São compostas por uma camada mucosa, uma camada de músculo liso e uma túnica serosa. Em ratas, é dividida em quatro segmentos, pré-ampola, ampola, istmo e intramural (MOLINA, 2014). O útero dependendo da espécie animal, pode apresentar formas anatômicas diversas. Em humanos, o útero tem formato de pêra invertido, e em roedores é formado por dois cornos que se unem na região da cérvix vaginal (**Figura 2**). O colo uterino anatomicamente divide-se em duas porções, chamadas de ectocérvice e endocérvice (PLEWKA, 2007).

A cavidade endocervical possui função secretora e locomotora. A porção ectocérvice apresenta três estratos de células escamosas, camada profunda, constituída por uma camada de células basais e várias de células parabasais; extrato intermediário, constituído por várias camadas de células intermediárias e extrato superficial, constituído por várias camadas de células superficiais (PLEWKA, 2007; TAPIA, 2008).

A vagina é uma estrutura fortemente vascularizada e composta por três camadas: mucosa, muscular e camada adventícia (CUZIN, 2012). A vulva designa genericamente o conjunto de estruturas que compõem a genitália externa feminina, sendo constituída pelos grandes e pequenos lábios, pelo espaço interlabial, no qual se inclui o vestíbulo, o meato urinário, o orifício inferior da vagina e o hímen, pelos órgãos erécteis, representados pelo clitóris e bulbos vestibulares, e pelas glândulas anexas, as glândulas parauretrais e as glândulas vestibulares (Bartholin) (HENNEKAM et al., 2013).

1.3.1 Regulação hormonal feminina

Em idade reprodutiva as mulheres normais produzem todas as três classes de esteroides sexuais, os androgênios, as progestinas e os estrógenos (LIMA-VERDE et al., 2011). Os androgênios são precursores dos estrogênios, e estão relacionados ao aumento da libido, da massa muscular, do desenvolvimento normal do folículo ovariano e de sua atresia (ESTRADA et al., 2017).

A progesterona é produzida no corpo lúteo, sendo de grande importância para as funções de ovulação, desenvolvimento uterino, das glândulas mamárias, e pela expressão neurocomportamental associada com a capacidade de resposta sexual (ARAUJO et al., 2015). Os estrogênios (estradiol, estrona e estriol) são secretados por tecidos reprodutores (folículos ovarianos, corpo lúteo e pela placenta na gravidez), por tecidos não reprodutores (tecido adiposo, neurônios do hipotálamo e músculo), e, ainda, podem ser derivados da reação de aromatização dos androgênios nos tecidos periféricos (ESTRADA et al., 2017).

O estrogênio e a testosterona desempenham importantes papéis na regulação da função sexual feminina (ZHENG, 2012). Níveis baixos de testosterona são associados à diminuição da excitação sexual, libido, orgasmo e sensação genital, e o declínio nos níveis de estrogênio sérico resulta em afinamento do epitélio da mucosa vaginal e atrofia do músculo liso da parede vaginal e torna o ambiente do canal vaginal menos ácido, o que leva a infecções vaginais, infecções do trato urinário e incontinência, bem como queixas de disfunção sexual (SALLES; ARAÚJO, 2010).

Durante o ciclo menstrual, ocorrem alterações rítmicas mensais na secreção dos hormônios citados, mudanças nos ovários e órgãos sexuais que dura em média 28 dias. Estando dividido em dois segmentos, o ciclo ovariano (fase folicular e fase lútea) e o ciclo uterino (proliferativa e secretora) (BEREK, 2007; GUYTON; HALL, 2012). No ciclo ovariano, a fase folicular corresponde aos primeiros 14 dias do ciclo menstrual e é marcada pela secreção de estrogênio e pelo crescimento de novos folículos. Após a ovulação, a célula secretora do folículo transforma-se no corpo lúteo, que secreta grande quantidade de progesterona e estrogênio, e após duas semanas, o corpo lúteo degenera, e inicia-se a menstruação, devido à queda acentuada dos hormônios ovarianos (SELGRADE; HARRIS; PASTEUR, 2009; CARVALHO et al., 2010).

1.3.2 Atividade sexual feminina

No ciclo da resposta sexual da mulher, os toques e carícias exercem um papel mais decisivo que os estímulos visuais. Ao serem estimuladas, a primeira mudança que ocorre é o aumento do fluxo sanguíneo genital ao mesmo tempo que se observa a contração dos músculos perineais. Segundos após o aumento do fluxo sanguíneo vaginal, inicia-se a lubrificação vaginal, decorrente das secreções das glândulas uterinas, que facilita a entrada do pênis (COCCHIO et al., 2018).

Os lábios internos aumentam sua espessura e empurram os lábios maiores, tornando a vagina mais espessa e os músculos por todo o corpo, ficam tensos e se contraem, a frequência cardíaca e respiratória aumenta e os mamilos tornam-se eretos. Com a estimulação clitoriana ou pela pressão da parede vaginal, ocorre o orgasmo, ocasionando uma tensão corporal e intumescência pélvica para então se alcançar o clímax. Após o orgasmo, o corpo retorna ao estado de não excitação (SNOEREN et al., 2014).

Ao contrário do homem, a mulher pode apresentar múltiplos orgasmos, e não apresenta o período refratário imediatamente após o clímax, quando o pênis se torna flácido, sendo necessário nova estimulação para que ocorra ereção e possivelmente um orgasmo. Após a menopausa com a diminuição dos níveis de estrogênio circulante, as mulheres apresentam alterações sexuais, como atrofia da musculatura lisa, alteração de pH vaginal e no limiar sensitivo (HEIJKOOP; HUIJGENS; SNOEREN, 2017).

Em animais de laboratório, a capacidade sexual feminina é fácil de observar e medir no rato de laboratório, pela apresentação de lordose, contudo, se uma rata feminina é ou não motivada sexualmente e a extensão da motivação, não é tão fácil de quantificar. Assim, o comportamento sexual feminino, além de ser avaliado pela capacidade de lordose, pode se incluir os seguintes fatores: atratividade, proximidade, e receptividade (KOHTZ; WALF; FRYE, 2017) (**Figura 3**).

Figura 3 - Reconhecimento pela liberação de ferormônios na região anogenital.

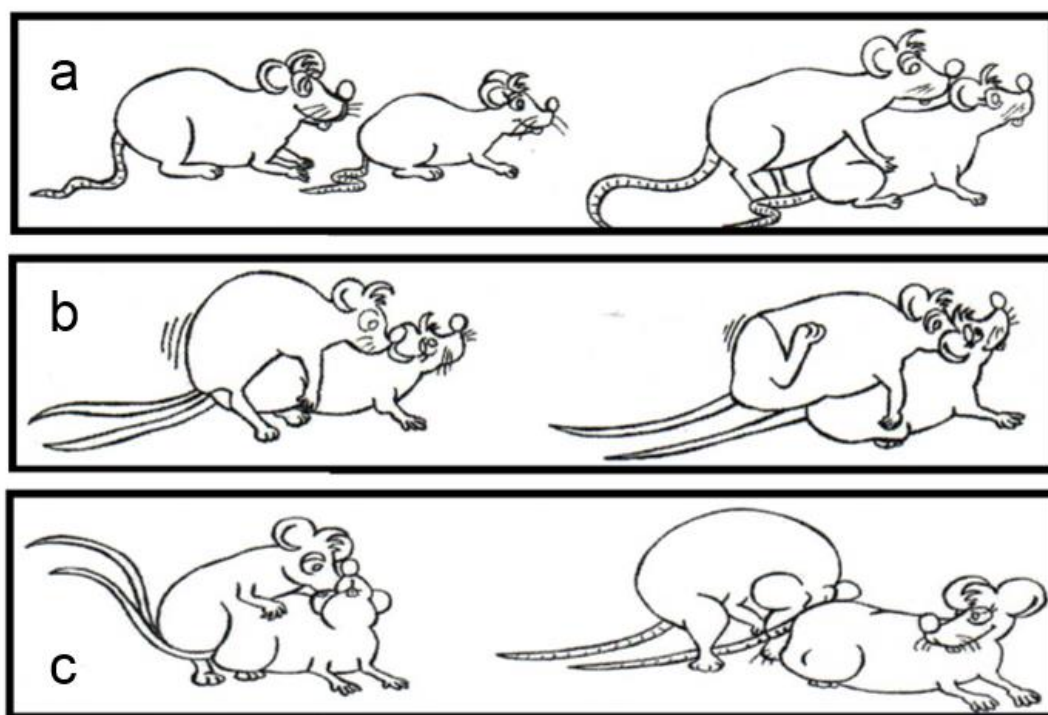


Fonte: Autor (2017).

1.4 INTERAÇÃO SEXUAL- CICLO DE COPULAÇÃO DE RATOS

Quando os ratos têm a possibilidade de se acasalar com vários parceiros simultaneamente, ambos os ratos machos e as fêmeas preferem os parceiros que os abordam primeiro (SNOEREN et al., 2011; MOENE; SNOEREN, 2018). A identificação e reconhecimento do indivíduo ocorrem pelo cheiro inato de cada espécie, que é resultado da liberação de substâncias químicas denominadas ferormônios, que nos roedores, são liberados na região anogenital (CHU; AGMO, 2014). O ciclo de copulação pode ser dividido em três partes, fase precopulatória, fase de copulação e fase executiva (AGMO; SNOEREN, 2017) (**Figura 4**).

Figura 4 - Atratividade (a), proximidade (b), e receptividade (c) no ciclo copulatório.



Fonte: Geradin (2006).

Durante a fase precopulatória, acontece a atratividade, o macho se aproxima da fêmea, ambos interagem e se aproximam para cheirar uns aos outros na região anogenital, para obter indícios ferormônais de receptividade sexual, ocorre a monta e palpamento do flaco. A fêmea apresenta comportamento de proximidade (**Figura 4a**) (SNOEREN et al., 2014; AGMO; SNOEREN, 2017; MOENE; SNOEREN, 2018).

A receptividade é a aceitação da fêmea para uma cópula bem sucedida, em que ocorre empurrão raso da pelve sobre a fêmea antes da penetração e depois um chute alto e intenso de uma ou ambas patas posteriores logo após a penetração, e a fêmea

receptiva promove o reflexo de lordose, que é a característica mais proeminente da receptividade da fêmea (**Figura 4b**) (AUWAD; HAGI, 2012; HEIJKOOP et al., 2017). A apresentação da lordose é muito importante para o sucesso reprodutivo em ratos, pois é o que permite a inserção peniana pelo macho, e eventualmente a ejaculação, cumprindo a função biológica da sexualidade (BERGHEIM; CHU; AGMO, 2015).

Após uma série de montagens e intromissões, estes comportamentos tendem a prosseguir, sendo interrompidos por autolimpeza, descanso e ritmo pela fêmea (comportamento desenfreado). A ejaculação constitui a fase executiva para o macho, em que a fêmea se afasta, e após permanecem separados, seguido por um período de inatividade masculina, geralmente durando cerca de 5 minutos, chamado de intervalo pós-ejaculatório que é finalizado com um novo ciclo de comportamento sexual (**Figura 4c**) (SNOEREN, 2015; AGMO; SNOEREN, 2017).

1.5 PLANTAS MEDICINAIS E REPRODUÇÃO

A medicina tradicional se faz presente nos dias de hoje e vem sendo praticada mesmo diante dos grandes avanços da medicina moderna, com as plantas e os extratos obtidos de suas partes utilizadas no tratamento de diversidade doenças (SINGH; NAIR; GRUPTA, 2012). Contudo, a crença de que produtos naturais utilizados como medicamentos são seguros, são atrativos para crianças, mulheres grávidas e idosos (ARRUDA, 2011).

Os primeiros relatos do uso de plantas no tratamento de doenças datam dos séculos II e III antes da era cristã (TYLER, 1987). No século XVI, o médico Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, mais conhecido como Paracelsus (1493-1541), formulou a teoria das assinaturas, em que semelhante cura semelhante. Atualmente muitas plantas são descritas na literatura com potencial tóxico sobre o sistema reprodutor, evidenciando efeitos embriotóxico, teratogênico, abortivo, sobre a fertilidade, morfologia dos órgãos reprodutores, gestação e parturição (NUNES et al., 2010).

Na década de 1950, nas áreas rurais da China, descobriu-se que a redução nos parâmetros reprodutivos masculinos estava relacionada à alimentação, sendo comum o uso de óleo de algodão, rico em gossipol (GADELHA et al., 2011). Estudo demonstrou que este composto promove redução na qualidade do sêmen (motilidade e concentração) e redução da libido, dano celular e degeneração de túbulos seminíferos, interferência no

ciclo estral das fêmeas e interrupção do desenvolvimento embrionário precoce (EL-SHARAKY et al., 2010).

As espécies *Azadirachta indica* A. Juss, *Anthocephalus cadamba* Miq. Roxb, *Capparis aphylla* Roth e *Drynaria quercifolia* (L.) J. Smith, são de origem asiática. A *A. indica* é conhecida popularmente pelos nomes de neen, nim, margosa, nime, muito utilizada como inseticida, acaricida, fungicida, nematicida, medicamento e cosmético e quando administrado o pó das folhas desta planta na dose de 200 mg/kg de peso corpóreo, ao longo de 28 dias, foi observado redução da fertilidade de ratos e alterações morfológicas reversíveis após 42 dias ao tratamento, no epitélio seminífero testicular (D'CRUZ et al., 2010).

A espécie *A. cadamba* em estudo conduzido por Shaikh e colaboradores (2015), apresentou atividade abortiva, estrogênica e uterotrófica pela administração do extrato metanólico das cascas do tronco.

Capparis aphylla bastante utilizada para o tratamento de uma variedade de desordens cardiovasculares, teve seu extrato etanólico administrado em ratos machos em estudo conduzido por Revathi et al. (2010), e foi observado perda total de fertilidade, com declínio da contagem e motilidade de espermatozoides, levando ainda a alterações estruturais nos testículos, indicando esta espécie como potente contraceptivo masculino.

O rizoma fresco de *D. quercifolia* é uma das partes da planta usada tradicionalmente por diferentes comunidades étnicas na Índia para controle de natalidade como agente antifertilidade (RAJENDRAN; RAJAN, 1996; DAS et al., 2012). Estudo realizado por Das e colaboradores (2014), com o extrato metanólico do rizoma de *D. Quercifolia* demonstrou atividade abortiva e antiimplantação. No continente africano muitas espécies são utilizadas como contraceptivos, tais como *Parkia clappertoniana*, *Carpolobia lutea*, *Ficus platyphylla* Del. Holl e *Pouzolzia mixta* (ETTEBONG et al., 2011; BOYE et al., 2016).

As sementes de *P. clappertoniana* na república do Gana, são consumidas em várias formas pela população, incluindo mulheres grávidas e crianças, e em estudo realizado por Boye e colaboradores (2016), o extrato aquoso de sementes de *P. clappertoniana* foi avaliado sobre o desempenho reprodutivo e a toxicidade, em diferentes períodos gestacionais (1-7, 8-14 e 15 dias de gestação) e diferentes concentrações (200 e 500 mg/kg), sendo comparado com solução salina, citotec (misoprostol) e ácido fólico. A administração oral deste extrato melhorou o desempenho reprodutivo em roedores, sem que ocasiona-se toxicidade materna e alterações no desenvolvimento da prole.

Em 2011, foi realizado estudo para avaliar a atividade contraceptiva, estrogênica e antiestrogênica do extrato metanólico da raiz de *C. lutea*. Os resultados observados demonstraram que não houve anormalidade nos filhotes, nos ratos tratados com o extrato em doses baixas demonstraram efeito estrogênico, e em doses elevadas demonstraram ação antiestrogênica. Portanto, confirmando o uso tradicional de *C. lutea* no controle da fertilidade (ETTEBONG et al., 2011).

F. platyphylla é uma planta amplamente distribuída em toda a região de savana da África Ocidental, e tem sido descrita para o tratamento de vários problemas de fertilidade (CHINDO et al., 2003; REYES-GARCÍA, 2010). Esta espécie teve o extrato aquoso combinado de folhas e raiz, imitando assim a forma de preparado utilizado, administrado em fêmeas de *Rattus norvegicus* Wistar grávidas, em comparação com Citrato de Clomifeno, para investigar vários índices reprodutivos. Os resultados deste estudo demonstraram que o extrato promoveu a fertilidade, mantendo a integridade uterina, aumentando o número de filhotes, sem que se apresente qualquer efeito teratogênico (UGWAH-OGUEJIOFOR et al., 2011).

Na Turquia, no mediterrâneo são cultivadas espécies de *Salvia*, principalmente a *Salvia fruticosa*. A ingestão de extrato etanólico e aquoso das folhas (200, 400 e 800 mg/kg), no período de pré-implantação (d1-d6), não causou mortalidade nas progênitoras, porém, reduziu o número de fetos viáveis e aumentou o número de reabsorções, e ainda apresentaram atividade anti-implantação e anti-fertilidade.

Em estudo conduzido por Sewani-Rusike (2013), extratos aquoso e etanólico de *P.* apresentaram efeito antifertilidade, sendo este efeito atribuído a efeitos anti-implantação, estrogênicos e ocitócicos dos extratos.

A espécie *Lepidium meyenii* é nativa da região dos Andes no Peru, mas pode ser encontrada na Bolívia, Colômbia, Chile e Argentina (CARDENAS, 2005). Na medicina tradicional peruana, *L. meyenii*, é utilizada para aumentar a vitalidade, promover a libido, aumentar a fertilidade e o desempenho sexual de ambos os sexos (MUMMENHOFF et al., 2009). Em estudo realizado com esta planta, a administração de 66,7 mg/kg de extrato duas vezes ao dia ao longo de 14 dias, aumentou significativamente o número de células de Sertoli, células de Leydig e espermatozoides, mas não influenciou a qualidade dos espermatozoides (REATEGUI et al., 2009).

Segundo Cabral e Pasa (2009), no Brasil existe três influências na formação da medicina popular, sendo estas, a colonização portuguesa, a participação indígena e a cultura africana. O barbatimão é representado por cinco espécies com distribuição geográfica em todas as regiões do país, principalmente no Bioma do Cerrado:

Stryphnodendron adstringens, *S. obovatum*, *S. polyphyllum*, *S. coriaceum* e *S. rotundifolium*. O extrato das sementes foi testado em ratas grávidas, sendo observado alterações da zona basal da placenta, acarretando a morte embrionária, atrofia do corpo lúteo, redução de peso uterino (VITRAL et al., 1987; BÜRGER et al., 1999).

A arruda (*Ruta graveolens* L.) é uma das plantas mais comumente utilizadas para indução de aborto no Brasil e em outros países da América e região Mediterrânea e os dados existentes são contraditórios com relação aos efeitos da arruda sobre os diferentes períodos gestacionais. Em estudo realizado por Kong e colaboradores (1988), o extrato clorofórmico das partes da planta, foi administrado em animais no período de pré-implantação, sendo observado atividade anti-fertilidade.

O extrato alcoólico de *R. graveolens* administrado a ratas no mesmo período gestacional causou redução no número de células do blastócisto e retardo no desenvolvimento embrionário (GUTIÉRREZ-PAJARES et al., 2003). Posteriormente, Freitas, Augusto e Montanari (2005), administraram oralmente o extrato hidroalcoólico liofilizado das partes aéreas na dose de 1000 mg/kg/dia a camundongos no período de pré-implantação (d1-d3, d4-d6 e d7-d9), não sendo observado aborto ou reabsorção embrionária, contudo, foi encontrado morte fetal.

O falso boldo (*Coleus barbatius*) quando administrado em roedores no período de pré-implantação, causa perda embrionária e desenvolvimento retardado (ALMEIDA; LEMONICA, 2000). Em outro estudo, conduzido por Brandolt et al., (2007), não foi observado qualquer sinal de toxicidade ou anomalias congênitas as proles dos diferentes tratamentos.

Quebra-pedra (*Phyllanthus amarus*) é citado em vários estudos, como espécie que não pode ser utilizada durante a gravidez, por possuir princípios ativos com capacidade de atravessar a barreira placentária, podendo provocar aborto, e também serem excretadas no leite materno (SILVA; SALLES, 2004; SILVA et al., 2013).

Matsui e colaboradores (1967) avaliaram o efeito do extrato aquoso da *Maytenus ilicifolia* conhecida popularmente como espinheira-santa, sobre a fertilidade de camundongos Swiss. Para tanto expuseram camundongos fêmeas e machos à administração intraperitoneal, duas vezes ao dia, a 0,05 e 0,2 mL do extrato durante cinco dias anteriores e nos cinco primeiros dias da prenhez. Os autores relataram que os animais não apresentaram alterações na libido, no ganho de massa corporal, na fertilidade ou no ciclo estral quando comparados com o grupo controle. De maneira semelhante, não houve alteração no tamanho da ninhada, nem presença de anormalidades nos descendentes quando comparados com o controle.

Em 1998, o efeito do extrato etanólico das folhas foi testado nas doses de 200 mg/kg por 20 dias (intraperitoneal) e 300 mg/kg por 30 dias (oral) em camundongos machos, sendo então observado células germinativas imaturas e/ou mortas com núcleos picnóticos e vacuolizações nos túbulos seminíferos, contudo, a produção espermática não foi afetada, sugerindo que esta substância não suprime a espermatogênese (MONTANARI et al., 1998).

O extrato hidroetanólico desta espécie foi testado em 2002, sendo administrado oralmente em camundongos em períodos distintos da gestação. Sendo observado efeito abortivo no período de pré-implantação em algumas progenitoras (MONTANARI; BEVILACQUA, 2002). Quanto ao extrato hidroacêtonico de *M. ilicifolia*, estudo demonstrou que a administração das doses de 3,9 e 15,1 mg/ kg durante 20 dias, não ocasionou efeito teratogênico ou qualquer sinal de toxicidade materna (CUNHA-LAURA et al., 2014).

A espécie *Pradosia huberi* Duckem é nativa da floresta Amazônica, sendo conhecida popularmente como “casca doce” ou “pau doce”, vem sendo utilizada pela medicina popular, devido ao seu potencial terapêutico para doenças gastrointestinais (KUSHIMA et al., 2005). Foram encontrados no extrato hidroalcóolico das cascas do caule de *P. huberi* compostos bioativos, como flavonoides, esteroides, saponinas e triterpenos. Os flavonoides, são compostos conhecidos por apresentar efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutor como atividade estrogênica, antiandrogênica e por interferir na fertilidade (SANTOS, 2011).

Em estudo conduzido por Santos et al. (2016), com o objetivo de investigar a toxicidade de *P. huberi* na fertilidade masculina, ratos Wistar machos foram tratados com extrato hidroalcóolico da casca do caule em doses de 1,22, 6,1 e 30,5 mg/kg, uma vez por dia, durante 63 dias. Na última semana de tratamento (do 57º ao 63º dia), os machos foram acasalados com fêmeas virgens não tratadas e eutanasiados no 64º dia.

Os resultados demonstram que a produção de gametas e sua morfologia não diferiram entre os grupos controle e tratados, e a capacidade de acasalamento não foi prejudicada, mas causou aumento no índice de perda pré-implantação, redução no índice de implantação, e no índice de perda pós-implantação de ratas fêmeas acasaladas com ratos tratados nas doses de 6,1 e 30,5 mg/kg, respectivamente, indicando uma possível ação tóxica desta espécie no sistema reprodutivo de ratos.

Ginkgo biloba, foi investigada sobre a fertilidade de ratos machos tratados com 17 mg/kg por 91 dias e fêmeas por 77 dias. Os resultados demonstraram que esta espécie não afetou o peso e morfologia dos testículos, útero, ovários, e nem na prole

(CASTRO et al., 2005). Os resultados foram confirmados em estudo realizado por Fernandes e colaboradores (2010), em que ratas grávidas tratadas durante o período de trânsito tubular e implantação com extrato aquoso de *G. biloba* nas doses de 3,5, 7 e 14 mg/kg/dia, não foram observados efeito tóxico no organismo materno e não houve morte embrionária, retardo de crescimento ou malformações fetais.

Em 2012, Kuntze e colaboradores estudaram os efeitos de *G. biloba* sobre a reprodução de ratos machos e fêmeas Wistar. Sendo observado que o extrato administrado na dose de 120 mg/kg, durante 15 dias consecutivos, não promoveu alterações nos testículos e ovários, não comprometeram o desempenho reprodutivo dos animais.

Himatanthus sucuuba (Spruce) Woodson, é uma árvore de grande porte conhecida como sucuuba (apresenta como composto químico os iridóides, pertencente a classe de terpeno) e nativa da região Amazônica (CORREIA, 1989). Em estudo realizado por Guerra e Peters (1991), o tratamento com a decocção das cascas do caule de *H. Sucuuba* (80 mg/kg), no período de pré-implantação, provocou baixa toxicidade reprodutiva e potencialidade teratogênica. Em 2015, o tratamento com *H. sucuuba* no período de pré-implantação e organogênese (d0-14), causou restrição de crescimento intrauterino, perda pré-implantação e atraso no desenvolvimento nas altas doses testadas (SOUSA SOARES, 2015).

Outra espécie estudada quanto ao potencial toxicante para gestantes foi a copaiba. No trabalho conduzido por Sachetti e colaboradores (2011), ratas Wistar grávidas foram tratadas com óleo resina da copaíba (*Copaifera sp.*), nas doses de 500, 1000 e 1250 mg/kg/dia) do sexto ao nono dia de gestação. As doses mais elevadas (1000 e 1250 mg/kg), ocasionaram toxicidade materna e embriotóxica, no entanto, não houve mortes embrionárias ou malformações fetais. Outro estudo, realizado em 2011, o creme vaginal contendo 2,5% de óleo resina de copaiba foi introduzido no canal vaginal de ratas durante 30 dias antes da grávidas e durante todo o período de gestação, não sendo observado qualquer sinal de toxicidade tanto para progênitora como para os embriões (LIMA et al., 2011).

Bauhinia monandra Kurz, conhecida vulgarmente como “pata-de-vaca” na Amazônia, possui grande valor econômico, sendo utilizada com fins ornamental, forrageiro e principalmente medicinal (MARTINS et al., 1995). Os extratos aquosos e etanólicos das folhas secas de *B. monandra* nas doses de 1.400 e 7.000 mg/kg/dia, não ocasionaram toxicidade materna ou fetal. Contudo, o extrato aquoso promoveu aumento

da implantação e diminuição da perda pós-implantação nas ratas prenhas (MENDES et al., 2010).

No território brasileiro e nas américas a espécie *Pfaffia glomerata* ocorre naturalmente, sendo conhecido como ginseng brasileiro (GOMES et al., 2010; MENDES, 2011). No tratamento com Ginseng foi possível observar malformações externas, viscerais e esqueléticas, atraso no desenvolvimento fetal (TOLEDO et al., 2004).

Em estudo realizado por Sá e colaboradores (2014), ratas wistar foram expostas ao extrato hidroetanólico das cascas do caule de *Endopleura uchi* por via oral, durante os períodos de pré-implantação, organogênese e desenvolvimento fetal. A espécie citada demonstrou segurança no período de pré-implantação do blastocisto no útero, no período de organogênese, e apesar de alterar as perdas pós-implantes, não alterou significativamente nenhum dos outros parâmetros analisados. No período de desenvolvimento fetal, mostrou-se seguro, apenas alterando as características sexuais das fêmeas.

Artemisia vulgaris L., conhecida popularmente como losnabrava, é uma espécie originária da Ásia e que vem se proliferando no Sul e Sudeste do Brasil (LORENZI, 1982). O extrato metanólico das folhas de *Artemisia vulgaris* apresentou forte atividade anti-implantação e atividade estrogênica, sugerindo ter atividade antifertilidade (SHAIK et al., 2014).

Croton urucurana é comumente encontrado no sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai (BARBIERI et al., 2014). Em estudo, foi avaliado o efeito do extrato aquoso de látex desta espécie, tendo o tratamento causado toxicidade materna, afetando o desenvolvimento fetal embrionário (MORAES-SOUZA et al., 2017).

Percebe-se que o uso de plantas é bastante elevado, pois apresentam alto índice de efeitos terapêuticos com baixa ocorrência de efeitos colaterais. Nos casos de disfunções sexuais, plantas podem atuar como afrodisíacas melhorando as fases da resposta sexual em ambos os sexos. Contudo, se não investigado adequadamente, podem acabar interferindo negativamente na fertilidade do indivíduo, dificultando o seu processo reprodutivo (LOHIYA; MANIVANNAN; GARG, 2006; KUSEMIJU et al., 2010).

1.6 *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen

A espécie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen é conhecida popularmente como jambu, agrião-do-Pará, agrião-do-norte, agrião-bravo, agrião-do-brasil e botão-de-ouro, originária na América do Sul, bastante cultivada e utilizada como tempero na culinária da

região norte do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002; PRACHAYASITTIKUL et al., 2009; FAVORETO; GILBERT, 2010).

Possui porte herbáceo, medindo entre 30 a 60 cm de altura, com folhas compostas, opostas, membranáceas e pecioladas, inflorescências compostas de flores amarelas dispostas em seções globulares terminais, de aproximadamente 1 cm, caule cilíndrico e carnoso, sendo a raiz principal do tipo pivotante, com abundantes ramificações laterais (HIND et al., 2003; FAVORETO; GILBERT, 2010).

As sinónimas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen são: *Spilanthus oleracea* L., *Cotula pyretharia* L., *Pyrethrum spilanthus* Medik., *Spilanthus acmella* var *oleracea* (L.), *Spilanthus fusca* Mart., *Bidens fervida* Lan., *Bidens fusca* Lan., *Isocarpa pyrethraria* (L.) Cass, *Spilanthus radicans* Schrad. Ex D. C e *Spilanthus oleracea* b *fusca* (Lam.) D. C. (LORENZI; MATOS, 2002; HIND et al., 2003) **(Figura 5)**.

Figura 5 - *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen



Fonte: Autor (2017).

1.6.1 Composição química

Em 1957, Jacobson descreveu a presença de uma substância chamada de espilantol. Trata-se de um exemplo de alquilamida, que são os principais metabolitos isolados das flores e folhas de *A. oleracea* (BOONEN et al., 2010). Trata-se de uma amida alifática, de fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$, descrita como um óleo viscoso, ardente,

de coloração amarelo claro, responsável pela produção do efeito de formigamento, que vem despertando interesse da indústria farmacêutica (BOONEN, 2010; PRACHAYASITTIKUL et al., 2013).

Borges (2012) relata que na composição química desta planta inclui ainda os compostos majoritários trans-cariofileno, germacreno D, L-dodeceno e espatulenol. A composição físico-química das folhas frescas de *A. oleracea* apresenta cálcio, fósforo, ferro, água, proteínas, lipídios, carboidratos, fibra, cinza, vitamina B1, B2, niacina, vitamina C e outros elementos químicos (REVILLA, 2001).

O estudo preliminar da composição química do extrato aquoso das folhas de *A. oleracea*, mostrou a presença de saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis, alcalóides, esteróides e triterpenóides (PINHEIRO et al., 2015). No mesmo ano, Romão e colaboradores investigaram a composição do extrato aquoso das flores, em que a análise fitoquímica indicou a presença de flavonoides e alcaloides. Em outra investigação fitoquímica das flores de *A. oleracea*, houve o isolamento de uma nova alquilamida, (2E, 5Z) -N-isobutilundeca-2,5-dieno-8,10-diinamida, juntamente com quatro análogos já descritos na literatura (CHENG et al., 2015).

Segundo Armond (2007), em triagem química da parte aérea de plantas de jambu através da técnica de cromatografia de camada delgada, foi confirmada a presença de óleos essenciais em até 0,7%, flavonóides, espilantina, espilantol, spilol, afinina, colina e fitosterina. Bae e colaboradores (2010), demonstraram que a técnica de HPLC-MS é eficaz tanto para análise quantitativa como para análise qualitativa de espilantol. Revelando ainda que este composto extraído em etanol é estável por mais de seis meses, mesmo em alta temperatura.

1.6.2 Propriedades farmacológicas de *A. oleracea*

Na literatura são descritas várias atividades farmacológicas tanto do extrato, como do espilantol isolado, dentre estas, tem-se comprovada as atividades como:

1.6.2.1 Anestésico

Andrade e colaboradores (2013) observaram efeito anestésico de formulação (pomada) contendo jambu. Os autores inseriram uma agulha na mucosa bucal (sulco vestibular acima da eminência canina) de voluntários e avaliaram a resposta à dor por meio de escala visual e variação da frequência cardíaca. Os resultados demonstraram

que não houve diferença estatística no efeito anestésico entre o grupo que utilizou a pomada contendo jambu e o grupo controle (benzocaína 20%) ($p < 0,05$). Portanto, a pomada de *A. oleracea* foi efetiva e segura na redução da dor local.

Em outro estudo, reportou-se a eficácia de um bioadesivo de quitosana contendo extrato de jambu, como uma alternativa em potencial como anestésico tópico oral (FREITAS, 2014).

1.6.2.2 Acaricida

Os estudos de Castro et al (2014) e Anholeto et al. (2016), demonstraram efeito acaricida dos extratos produzidos a partir das partes aéreas (flores, folhas e caule) de *A. oleracea*, sendo, portanto, esta espécie é uma ferramenta sustentável no controle de ectoparasitas.

1.6.2.3 Inseticida e larvicida

O extrato hexânico de *A. oleracea* mostrou alta atividade biológica frente as lavas de *Aedes aegyptii* e neonatos de *Helicoverpa zea* (RAMSEWAK et al., 1999). Em outro estudo conduzido por Moreno et al. (2012), o extrato bruto hexânico de *A. oleracea* demonstrou alta atividade inseticida, controlando a *Tuta absoluta*.

1.6.2.4 Antipirético

Estudo conduzido por Chakraborty e colaboradores (2010), induziu pirexia por leveduras em ratos, e a utilização do extrato de *A. oleracea* nas doses de 100, 200 e 400 mg produziu redução significativa da temperatura comparado a droga padrão utilizada (aspirina, 300 mg/kg). Tal atividade antipirética observada é atribuída a presença de flavonoides, inibidores predominantes de ciclo-oxigenase ou lipo-oxigenase (NARAYANA et al., 2001).

1.6.2.5 Anti-inflamatória e analgésica

Estudo realizado por Chakraborty e colaboradores (2004), avaliou-se a atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato aquoso das partes aéreas de *A. oleracea*, utilizando os modelos experimentais de edema de pata induzido por

carragenina, teste de retirada da cauda (*tail-flick*) e o modelo de contorções abdominais induzido por ácido acético. Os resultados observados de efeito anti-inflamatório e analgésico foram dose-dependente.

Ratnasooriya e Pieris (2005) demonstraram efeito anti-inflamatório e anti-hiperalgésico do extrato aquoso de flores frescas de jambu nas dosagens de 500, 1000 e 1500 mg/kg, administrado por via oral em ratos por meio dos modelos de dor inflamatória aguda e persistente com formalina e de hiperalgesia provocada por carragenina. Possivelmente, isto deve-se a inibição da síntese de prostaglandinas, exercendo assim, o extrato uma atividade anti-histamínica. Rios e colaboradores (2007) propuseram que o mecanismo de ação sugerido para o efeito analgésico do espilantol, seria o aumento na liberação do ácido gama-aminobutírico (GABA) no cérebro.

Wu et al. (2008) observaram através de testes *in vivo* com macrófagos RAW 264,7, e propuseram que o efeito anti-inflamatório do espilantol é pela inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios. Formulação em gel desenvolvida para uso tópico, contendo 1% do extrato de éter de petróleo a partir das flores de jambu, apresentou atividade anti-inflamatória semelhante à apresentada pelo diclofenaco de sódio em gel, no modelo de edema de pata induzido por carragenina (GRUPTA et al., 2012).

1.6.2.6 Antifúngica

Em 2006, Rani e colaboradores, isolaram o espilantol das inflorescências de *A. oleracea* e aplicaram em diferentes concentrações de fungos causadores de doenças em humanos como *Aspergillus flavus* e *A. paraciticu* e fungos causadores de doenças presentes na agricultura, o *Fusarium oxysporium* e *F. moniliformis*, mostrando atividade biológica em várias concentrações de espilantol.

1.6.2.7 Diurética

Em estudo realizado por Ratnasooriya e colaboradores (2004), o extrato aquoso das folhas de *A. oleracea* apresentou forte ação diurética, e a diurese induzida pelo extrato apresentou intensidade semelhante à do fármaco furosemida, com presença de urina acidificada. Além disso, a ação diurética do extrato ocorreu rapidamente, sendo de longa duração. Portanto, um perfil diurético atraente, restringindo a frequência de administrações. Estes resultados foram também observados por Yadav et al. (2011), com o extrato etanólico das folhas de *A. oleracea* na dose de 500 mg/kg/v.o.

Gerbino e colaboradores (2016) observaram que o espilato ocasionou inibição induzida na produção de adenosina monofosfato cíclica, modulando negativamente os mecanismos de concentração de urina. Estes estudos, portanto reforçam a possível utilização desta espécie como diurético pela população.

1.6.2.8 Antioxidante

Wongsawatkul et al. (2008) observaram que o extrato clorofórmico de *A. oleracea* apresentou atividade antioxidante *in vitro*. Em 2015, Pinheiro e colaboradores avaliaram o potencial antioxidante do extrato aquoso das folhas de *A. Oleracea* contra o radical DPPH. Observou-se que a atividade de redução na DPPH é diretamente proporcional a concentração de extrato utilizada (DE50% = 2,76 mg) (PINHEIRO et al., 2015). Ainda no mesmo ano, Romão e colaboradores (2015), também conduziram um estudo para determinar o potencial antioxidante, também pelo teste com DPPH, porém do extrato aquoso das flores de *A. oleracea*. Os resultados demonstraram que o extrato aquoso das flores de *A. oleracea* possui fraca capacidade antioxidante.

Hossain e colaboradores (2012) ao estudarem o potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas desta espécie, descobriram que esta atividade é devido a presença de taninos, flavonoides e compostos fenólicos.

1.6.2.9 Afrodisíaca

Sharma et al. (2011) estudou os efeitos afrodisíacos do extrato etanólico das flores *A. oleracea* em ratos machos, nas doses de 100 e 150 mg/kg por v.o, durante 28 dias. O tratamento ocasionou aumento de latência de montagem, latência de intromissão, frequência de ejaculação e intervalo pós-jaculatório, elevação nos níveis do hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), e da testosterona. A planta provou ser superior ao Viagra® em todos os aspectos estudados, exceto propriedades pró-eréteis.

Uma pomada contendo extrato de *A. oleracea* foi capaz de ocasionar o aumento no desejo, excitação e satisfação sexual em indivíduos de ambos os sexos, de maneira estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo placebo em um estudo clínico conduzido por Regatas (2008).

1.6.2.10 Antimicrobiana

A fração clorofórmica do extrato etanólico das flores *A. oleracea* apresentou inibição para *Salmonella typhi*, possibilitando a utilização de *A. oleracea* na conservação de alimentos (ALCANTARA et al., 2015). E no estudo conduzido por Arora et al. (2011), os resultados mostraram que os extratos de acetato de etila e metanol influenciam no desenvolvimento de estirpe da bactéria *Klebsiella pneumoniae* e o extrato aquoso e de acetato de etila atuam contra estirpes fúngicas de *Rhizopus stolonifer* e *R. Arrhigu*.

1.6.2.11 Antitumoral

Estudo realizado por Silva (2012) avaliou a citotoxicidade do extrato obtido das folhas de *A. oleracea* em diferentes estruturas vitais de células tumorais e não-tumorais. O extrato aplicado em culturas celulares apresentou uma importante redução da viabilidade celular, acarretando danos visíveis ao citoesqueleto, sendo observado grande número de células apoptóticas, podendo ser utilizado na terapia antitumoral.

Soares e colaboradores (2014) confirmaram esta atividade ao investigarem a citotoxicidade do extrato hidroetanólico das inflorescências de *A. oleracea* pelo ensaio MTT. Os resultados demonstraram uma IC₅₀ do extrato de 513 mg/mL, confirmando os dados obtidos do ensaio MTT que revelou atividade citotóxica. O arranjo de citoesqueleto mostrou despolimerização dos filamentos, ocasionando perda de morfologia e resultando em alterações na adesão celular.

1.6.2.12 Gastroproteção

Estudo conduzido por Nascimento e colaboradores (2013), demonstrou que o polissacarídeo Rhamnogalacturonano (RGal), isolado de *A. oleracea*, tem efeito gastroprotetor contra lesões gástricas agudas induzidas por etanol.

1.6.2.13 Arritmogênico

O espilantol mostrou-se arritmogênico em experimentos feitos em coração isolado de coelho, na dosagem de 40 mg/L, observando que esse ativo poderá servir como modelo para testar drogas antiarrítmicas (HERDY, 1984).

1.6.2.14 Antirrugas

A. oleracea está presente em diversas formulações utilizadas na estética por ser capaz de reduzir marcas de expressão, tal como as rugas, sem a necessidade de injeções (ARTARIA et al., 2011).

1.6.2.15 Promotor de absorção

O espilantol demonstrou capacidade como promotor de absorção de algumas substâncias como cafeína, testosterona e ibuprofeno, através da derme de maneira dose dependente (SPIEGELEER et al., 2013). O espilantol também foi capaz de permear a mucosa e a derme em modelos experimentais com célula vertical do tipo Franz (BOONEN et al., 2010)

1.6.3 Propriedades toxicológicas de *A. oleracea*

A toxicidade do espilantol e do extrato de jambu foi investigada por alguns autores que não observaram nenhuma mortalidade em ensaios de toxicidade aguda (CHACKRABORTY et al., 2004; SHARMA et al., 2011; YADAV et al., 2011; NOMURA et al., 2013).

Contudo, Cilia-Lopez e colaboradores (2010), observaram que o espilantol (1 mg/kg, via intraperitoneal) provocou efeito estimulante em camundongos, tais como aumento de atividade motora e irritabilidade, sendo efeito extinto após 180 minutos. Nomura et al. (2013) relataram que a maior dose utilizada no ensaio (5000 mg/kg) do extrato etanólico das flores frescas de *A. oleracea* foi capaz de causar nos animais alterações respiratórias e convulsões. Tais efeitos adversos já haviam sido reportados no estudo de Moreira et al. (1989) ao testar o extrato n-hexânico desta espécie, injetado por via intraperitoneal, o qual induziu a ocorrência de convulsões tônico-clônicas em ratos.

Tais reações, possivelmente, estão relacionadas à via de administração, pois os vários extratos de *A. oleracea* administrados pela via oral, não provocaram até o momento qualquer sintoma de intoxicação. Ressalta-se ainda que o jambu foi classificado como seguro (GRAS nº3783) pela Associação dos Fabricantes de Extratos e Flavorizantes (FEMA – Flavor and Extract Manufacturers Association) e é utilizado como flavorizante em diversos produtos (FEMA, 2000).

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do extrato hidroetanólico de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (EHAo) sobre variáveis de toxicidade sistêmica e reprodutiva, incluindo fertilidade e performance reprodutiva em machos e fêmeas.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Caracterizar quimicamente o EHAo;
- b) Avaliar os efeitos sobre a fertilidade e a performance reprodutiva de fêmeas;
- c) Examinar microscopicamente os ovários de ratas tratadas com EHAo;
- d) Avaliar os efeitos sobre a fertilidade de machos;
- e) Avaliar o comportamento sexual e parâmetros espermáticos de machos;
- f) Determinar as concentrações séricas de testosterona, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) de machos;
- g) Examinar macroscopicamente os órgãos reprodutivos.

3.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Absorção Atômica e Bioprospecção (sob a coordenação do Prof. Dr. Roberto Messias Bezerra), Laboratório de Pesquisa em Fármacos (sob a coordenação do Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho) e Laboratório de Toxicologia Reprodutiva (sob a coordenação da Prof. Dra. Clarissa Silva Lima), do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, situado na Rodovia Juscelino Kubitschek, Km-02 - Zerão – Macapá-AP- Brasil, no período de setembro/2016 a novembro/2017.

3.2 MATERIAL BOTÂNICO

As amostras de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen foram coletadas em setembro de 2016 no distrito de Fazendinha (S 0° 02'30.4"/W 51°06'37.5") - Macapá-Amapá, Brasil. Uma Exsicata da espécie foi depositada no Herbário IAN da Embrapa Oriental. Sob número de identificação N°. 196011.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO

As inflorescências frescas previamente selecionadas foram trituradas para obtenção de um pó de fina granulação, em seguida o material foi macerado a frio por 7 dias em solução hidroetanólica à 70%, na proporção de 1:4 em temperatura ambiente (BARBOSA; TAVARES, 2001). A solução extrativa resultante foi filtrada e posteriormente concentrada em rotaevaporador (Quimis Model Q 218.2) a 40°C. Posteriormente, o concentrado foi liofilizado, obtendo-se um rendimento de 2,5%.

3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO: AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE ESPILANTOL

3.4.1 Cromatografia Gasosa - Espectrometria de massas (CG-EM)

A identificação do constituinte majoritário do extrato das flores de *A. oleracea* foi por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GCMSQP2010 - SHIMADZU). As condições de análise foram: temperatura do injetor, 210 °C; temperatura do detector, 290°C com ionização por impacto de elétrons (70 eV); gás de arraste, Hélio; taxa de fluxo, 1 ml/min e taxa de injeção 1:20. A temperatura inicial foi de 120°C, por 2 min, com uma taxa de 6°C/min até 290 °C, permanecendo por 8 min, o tempo total de análise foi de 35 min. A coluna utilizada foi DB-5 (0,25 mm x 30 m x 0,25 µm). Um microlitro da amostra foi dissolvida em diclorometano (1:100 mg/µl).

3.5 PROTOCOLO ANIMAL

Os procedimentos experimentais foram empregados para investigar a toxicologia reprodutiva, em estudo de fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial, de acordo com o Seguimento I (BRASIL, 2013; OECD, 2015).

3.5.1 Descrição dos animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar albinos (*Rattus norvegicus*), isogênicos, machos (15) e fêmeas (15), com peso em torno de 200g a 250g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade de Campinas – UNICAMP e do Biotério do Laboratório de Pesquisa em Fármacos. Os animais foram alimentados com ração comercial (Labina®) e água “*and libitum*”, submetidos a ciclo fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, durante todo o experimento, em sala climatizada a 23±2°C, em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção e divididos em 3 grupos experimentais e cada grupo foi formado por 5 animais.

3.5.2 Avaliação ética

Todo o protocolo experimental esteve de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, obtendo aprovação prévia pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amapá, parecer nº 0020/2016 (ANEXO A).

3.6 ESTUDO DO USO DE EHAo EM FÊMEAS

Neste experimento, a avaliação experimental iniciou aos 90 dias de idade, e a administração do EHAo foi iniciada aos 104 dias de idade e decorreu até o fim da fase de pré-implantação (124 dias de idade), por ingestão forçada, gavagem e sempre pela manhã. Os grupos G1, G2 e G3 foram observados no período que compreende o período de pré-acasalamento, acasalamento e pré-implantação (**Quadro 1**). As doses foram estabelecidas a partir da DL₅₀ 889,14 mg/kg (NOMURA et al., 2013), correspondendo respectivamente à 10% da DL₅₀ (G2), e 50% da DL₅₀ (G3).

Quadro 1- Grupos experimentais para avaliar a performance reprodutiva de *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, fêmeas, tratadas com o EHAo e água destilada.

Animais	Grupos
Fêmeas (n=15)	G1: Ratas que receberam por via oral, 0,5 mL de água destilada, no período de 104 a 124 dias de idade (n = 5); G2: Ratas que receberam por via oral, uma dose correspondente a 88,91 mg/kg do EHAo, no período de 104 a 124 dias de idade (n = 5); G3: Ratas que receberam por via oral, uma dose correspondente a 444,57 mg/kg do EHAo, no período de 104 a 124 dias de idade (n = 5).

3.6.1 Determinação do ciclo estral por lavado vaginal

Neste estudo, foi realizado o lavado vaginal pela introdução de uma micropipeta contendo 20 µL de solução de cloreto de sódio a 0,9% e imediata recuperação. O material coletado foi, imediatamente, depositado sobre uma lâmina de vidro e analisado por meio de microscopia de luz, nas objetivas de 10 e 40x. A ponta da ponteira foi introduzida no orifício vaginal, com cuidado para não estimular a cérvix uterina (MARCONDES et al., 2012). A identificação de cada uma das fases do ciclo ocorreu, conforme o seguinte (**Quadro 2**):

Quadro 2- Identificação das fases do ciclo estral de ratas linhagem Wistar segundo Marcondes et al., (2012).

Fase	Características
Metaestro	Esse período apresenta concentrações baixas do nível sérico de estradiol e o esfregaço vaginal exhibe leucócitos, poucas células fusiformes cornificadas e algumas células epiteliais;
Diestro	Observa-se esfregaço com predominância de leucócitos;
Proestro	Com o aumento dos níveis séricos de estradiol, há atividade proliferativa do epitélio vaginal, com o predomínio de células arredondadas, polinucleadas que podem estar dispersas ou agrupadas. É nesta fase do ciclo que os níveis de estradiol estão mais altos e na qual ocorre o pico de LH;
Estro	Devido à queda dos níveis de estradiol coincidentemente com a ovulação e formação do corpo lúteo, há diminuição da proliferação do epitélio vaginal, apresentando esfregaço vaginal constituído predominantemente de células cornificadas, dando o aspecto de “folhas secas”.

A coleta foi realizada diariamente, no mesmo horário (entre 8:00 e 9:00 h), e o ciclo acompanhado por um mínimo de duas semanas (14 dias antes do início do tratamento), para ter a garantia de sua regularidade, e 14 dias durante o período de tratamento, para avaliar a ciclicidade. Os resultados individuais foram registrados e a frequência de cada fase, bem como o intervalo interestro foram determinados. O ciclo estral da rata dura entre 4 e 5 dias, sendo considerado prolongado se a rata permanecer em uma fase por mais de 4 dias (NAYANATARA et al., 2012).

3.6.2 Sinais de toxicidade

Durante a prenhes, as ratas foram observadas diariamente quanto a sinais clínicos de toxicidade como piloereção, diarreia, alterações na atividade locomotora e sangramento vaginal (CHRISTIAN, 2001).

3.6.3 Avaliação da massa ponderal

Para a avaliação diária da massa corpórea dos animais, foi utilizada balança Gehaka BG4000, com capacidade de 4200g e precisão de 0,1g. O ganho de massa foi

avaliado diariamente antes, durante o período de tratamento para determinação da quantidade de dose a ser administrada até o dpn6 e posteriormente no dpn13 para acompanhamento da prenhez. Sendo expressos nos gráficos os dias 1, 3, 7, 10 e 14 antes da prenhez e os dias 1, 3, 5 e 13 de prenhez.

3.6.4 Avaliação do consumo de água e ração

O consumo de água e ração foi mensurado diariamente, desde o início do tratamento, utilizando-se a mesma balança citada anteriormente. Diariamente foi disponibilizado 50g de ração e 200 mL de água para cada animal. Sendo expressos nos gráficos de água e ração, os dias 1, 3, 7, 10 e 14 antes da prenhez e os dias 1, 3, 5 e 12 de prenhez.

3.6.5 Acasalamento sincronizado

Sincronizou-se o estro nas fêmeas utilizando a interferência do hormônio denominado feromônio. O termo feromônio foi proposto por Karlson e Luscher (1959) para descrever substâncias que, secretadas por um organismo para o meio ambiente, são percebidas por um indivíduo da mesma espécie, desencadeando respostas comportamentais e endócrinas, secretado pelas glândulas prepúciais e liberado na urina do macho, possibilitando obter uma fecundação controlada. Para realização da sincronização do estro, as fêmeas foram expostas a gaiola com uma cama suja do macho por três dias antes do acasalamento (2 fêmeas para 1 macho).

A prenhez foi diagnosticada pela observação de espermatozoides no esfregaço vaginal e/ou a observação do tampão vaginal (sêmen solidificado que tampona o canal vaginal das fêmeas), sendo definido como 1º dia da gestação (d1). As ratas foram alojadas individualmente em caixas, sendo avaliado consumo de água, ração e desenvolvimento ponderal (LOHMILLER; SWING, 2006).

3.6.6 Coleta de sangue

Após o término do tratamento, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas, e após, foram anestesiados com tiopental sódico (35 mg/kg, i.p). A coleta de 5 mL de sangue foi realizada pelo plexo retrorbital, sendo acondicionado em dois tipos de tubos: um com anticoagulante EDTA para determinação dos parâmetros hematológicos e

outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro e avaliação dos parâmetros bioquímicos.

3.6.6.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3.500 rpm durante 10 minutos, para separar o soro dos elementos figurados do sangue. Posteriormente, procedeu-se a dosagem das enzimas plasmáticas, como aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamil transferase (GGT), do colesterol total e frações (HDL e LDL), triglicérides, glicose, creatinina e ureia, utilizando kits LABTEST® (ensaios enzimáticos colorimétricos e cinéticos colorimétricos) e o equipamento analisador bioquímico semiautomático modelo BIO-200.

3.6.6.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Para análise hematológica, fez-se o hemograma completo, determinando os valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, plaquetas e os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), utilizando analisador automático de células hematológicas HumaCount Plus.

3.6.7 Avaliação do desempenho reprodutivo

No décimo terceiro dia de gestação, as progenitoras foram eutanasiadas, retirado o útero e os dois ovários, procedendo a contagem do número dos sítios de implantação, em ambos os cornos uterinos, e o número de corpos lúteos dos ovários direito e esquerdo, com o auxílio de uma lupa NIKOW®, modelo SMZ 645 (C-W 10x A/22) e calculadas as perdas pré-implantes (OECD, 2001), pela fórmula:

$$\text{Perdas pré-implantação} = \text{nº de corpos lúteos} / \text{nº de implantes} \times 100.$$

3.6.8 Análise macroscópica, microscópica e peso relativo dos órgãos

3.6.8.1 Análise macroscópica dos órgãos

Em cada fêmea, ocorreu à observação de órgãos internos para identificação de lesões macroscópicas e a remoção do coração, pulmões, baço, rins, fígado, cérebro, ovários, útero gravídico e canal vaginal.

3.6.8.2 Peso relativo dos órgãos

O cálculo da massa relativa dos órgãos de cada animal foi realizado dividindo-se o peso de cada órgão (g) pelo peso corporal de cada animal no dia da coleta, e multiplicando-se o resultado por 100. O resultado está expresso em g/100g de peso vivo (g/100g p.v).

3.6.8.3 Análise microscópica dos ovários

Realizou-se a análise microscopia dos ovários, previamente conservados em formol 10%, os quais foram fragmentados em 5 mm de diâmetro para uma boa fixação. Esse material então foi lavado e deixado em álcool 70%, seguindo: desidratação (álcool 80%, 90% e absoluto), diafanização (Xilol), impregnação (parafina) e pôr fim a inclusão (parafina pura).

Para obtenção dos cortes histológicos, os blocos de parafina foram aparados, objetivando retirar o excesso de parafina dos lados da peça emblocada, para evitar o enrugamento dos cortes, e cortados utilizando micrótomo automático marca Slee medical® CUT 6062, com a espessura de 5µm. Com o auxílio de uma pinça os fragmentos da fita de cortes, foram colocados em banho-maria com água destilada a temperatura de 45° a 50°C, sendo dispostos em lâminas de vidro para microscopia óptica, previamente limpas e desengorduradas, e em seguida, as lâminas foram secas em estufa a 55°C. O material foi corado em hematoxilina de Harris-LABORCLIN® e eosina amarelada-INLAB®, e montadas com bálsamo do Canadá. Foram preparadas 5 lâminas por animal, em cada lâmina contendo 3-4 cortes, analisadas semiquantitativamente em microscópio óptico, Olympus-micronal® BX41 com aumento de 100x e 400x, fotografadas com câmera MDCE-5C USB 2.0 (digital), e examinadas às cegas, por dois observadores.

3.7 ESTUDO DO USO DO EHAo EM MACHOS

A administração do produto foi iniciada aos 90 dias de idade e decorreu até os 120 dias, por ingestão forçada, gavagem e sempre pela manhã. Os grupos G1, G2 e G3, foram observados quanto aos efeitos funcionais do órgão genital (**Quadro 3**).

Quadro 3 - Grupos experimentais para avaliar a performance reprodutiva de *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, machos, tratados com o EHAo e água destilada.

Animais	Grupos
Machos (n=15)	G1: Ratos que receberam por via oral, 0,5 mL de água destilada, durante 30 dias de tratamento (n = 5); G2: Ratos que receberam por via oral, uma dose correspondente a 88,91 mg/kg do EHAo, durante 30 dias de tratamento (n = 5); G3: Ratos que receberam por via oral, uma dose correspondente a 444,57 mg/kg do EHAo, durante 30 dias de tratamento (n =5).

3.7.1 Avaliação da massa ponderal

Para a avaliação diária da massa corpórea dos animais, foi utilizada balança Gehaka BG4000, com capacidade de 4200g e precisão de 0,1g. O ganho de massa foi avaliado durante os 30 dias de tratamento, estando expresso no gráfico, os dias 1, 7, 14, 21 e 30.

3.7.2 Avaliação do consumo de água e ração

O consumo de água e ração foi mensurado diariamente, sendo expresso os dias 2, 7, 14, 21 e 29 de tratamento, utilizando-se a balança citada anteriormente. Diariamente foi disponibilizado 100g de ração e 200 mL de água para cada animal.

3.7.3 Sinais de toxicidade

Durante o tratamento, os animais foram observados diariamente quanto a sinais clínicos de toxicidade como piloereção, diarreia, alterações na atividade locomotora e sangramento (CHRISTIAN, 2001).

3.7.4 Avaliação de parâmetros sexuais

3.7.4.1 Teste de motivação sexual

Este teste foi empregado com o objetivo de avaliar a preferência do rato entre uma fêmea sexualmente ativa (FSR) e um indivíduo do mesmo sexo (macho sexualmente ativo-MSA) de acordo com a metodologia descrita por Agmo (2003). Em momento algum (antes ou durante o teste) os ratos experimentais tiveram contato direto com os “animais-iscas”. Uma semana antes do teste os ratos machos foram habituados com a caixa de observação, porém sem a presença das fêmeas; para tanto eram colocados individualmente para explorá-la, por cinco minutos em 3 dias consecutivos (AGMO, 2003). A caixa de observação (90 x 30 x 30 cm) foi dividida em três partições igualmente espaçadas, por uma parede transparente que continha grades separando as áreas entre si (**Figura 6**).

Figura 6- Fotografia da caixa de experimentação utilizada para a realização dos testes de parâmetros sexuais.



Fonte: Pereira (2013).

Não houve o contato direto entre os animais, sendo permitido apenas a comunicação auditiva e olfativa entre os animais através das grades das paredes. No dia do teste, cada macho do experimento, 20 minutos após receber a dose diária do

tratamento, foi colocado no centro da caixa e filmado por 20 minutos com câmera (TP-LINK, Tpcamera V 2.6.0.18).

Para o teste de motivação sexual, a fêmea e o macho eram postos individualmente, em cada um dos compartimentos laterais, 20 minutos antes do início das observações dos animais testes, para a familiarização com a caixa. A cada macho testado, tanto a FSA, quanto o MSA eram substituídos por outra do mesmo grupo, desta forma evitava-se que ao serem utilizados em mais de um teste, perdesse o interesse em explorar a caixa e farejar o animal do compartimento vizinho.

Foi considerado como entrada nas áreas de incentivo, apenas a partir do momento em que o animal cruzava a linha de delimitação com as quatro patas ou quando farejava diretamente a gaiola de incentivo. Foi considerada como a “saída” do animal apenas quando o mesmo cruzou a linha com as quatro patas, voltando à zona neutra.

Foram avaliados para este teste, a frequência, a latência, o tempo total de duração para cada um dos seguintes parâmetros:

- a) Farejar a grade da fêmea sexualmente ativa;
- b) Farejar a grade do macho sexualmente ativo;
- c) Manipular ou lambear a região genital;
- d) Tempo restante, quando o animal executou comportamentos que não foram avaliados.

3.7.4.2 Teste de ereção peniana

A ereção peniana foi determinada a partir do método descrito por Thakur et al. (2009). Após um período de adaptação de 5 minutos, o ensaio foi iniciado colocando-se uma fêmea no estágio “estro” do ciclo estral do outro lado da gaiola. As gaiolas eram limpas, com álcool a 30%, antes de deslocar os animais de diferentes grupos (RODRIGUES-ALVES, 2007).

A ereção dos ratos foi marcada pela visibilidade do pênis para fora da bainha ou por aliciamento do pênis, o que é outro indicador de ereção peniana em ratos. O Índice de ereção do pênis (IEP) foi calculado de acordo com a metodologia relatada por Islam et al. (1991), por meio da multiplicação do percentual de ratos exibindo pelo menos um episódio de ereção peniana durante o período de observação de 30 minutos, com o número médio de ereções penianas:

$$IEP = \% \text{ de ratos com ereção peniana} \times n^{\circ} \text{ médio de ereções}$$

3.7.4.3 Teste de comportamento sexual

No período escuro, uma fêmea sexualmente receptiva foi inserida silenciosamente em um dos lados da caixa, como estímulo, e foram avaliados os seguintes parâmetros (THAKUR et al., 2009):

- a) **Comportamento de montagem:** a frequência de montagem (FM) foi determinada a partir da contagem do número de montagens pré-ejaculatórias com e sem penetração durante o período de observação e a latência de montagem (LM), calculada como o lapso temporal decorrido desde a introdução da fêmea até à ocorrência da primeira montagem;
- b) **Comportamento de penetração:** a latência de penetração (LP) foi calculada como o momento da primeira penetração observada após a introdução da fêmea na gaiola. A Frequência de Penetração (FP) foi considerada como o número total de penetrações (pré-ejaculatórias) dentro de 30 minutos;
- c) **Comportamento de ejaculação:** a frequência de ejaculação (FE) foi calculada como o número de ejaculações obtidas no período de 30 minutos e o intervalo pós-ejaculatório (IPEJ), foi considerado como o intervalo de tempo entre a ejaculação e a primeira montagem no período de 30 minutos.

3.7.4.3.1 Variáveis reprodutivas das fêmeas acasaladas

Após o término do teste do comportamento sexual, as ratas permaneceram com o mesmo macho, e no outro dia, foi realizado o esfregaço vaginal e a presença de espermatozoide foi indicativo de prenhes. Estas fêmeas foram avaliadas diariamente para acompanhamento do desenvolvimento embrionário e a gestação desenvolveu-se até o nascimento da progênie.

A partir do total de fêmeas acasaladas (que apresentaram espermatozoides na lâmina de esfregaço vaginal), fêmeas prenhes (que apresentaram filhotes, vivos ou não) e fêmeas que apresentaram filhotes, foram calculados os índices de fertilidade, virilidade e a taxa de acasalamento para cada grupo experimental (DAMASCENO et al., 2008). Para isso, utilizou-se as seguintes fórmulas:

Taxa de acasalamento = n° de fêmeas com espermatozoides / n° de fêmeas acasaladas x 100.

Índice de fertilidade = n° de fêmeas prenhas / n° de fêmeas que acasalaram x 100.

Índice de virilidade = n° de filhotes machos / n° total de filhotes x 100.

A fetotoxicidade foi avaliada pela morfologia externa, conforme os critérios: anormalidades do tronco e cauda, extremidades (tamanho, posição e dígitos), contorno do crânio, aspecto dos olhos e orelhas e forma da face e focinho de acordo com a metodologia proposta por Damasceno et al. (2008).

3.7.5 Dosagens hormonais

No último dia de tratamento, os animais foram anestesiados seguindo o protocolo anestésico com Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Ketamina (MASSONE, 2008), pesados e coletado o sangue do plexo retrorbital de ambos os grupos experimentais. O material, após centrifugação (3.500 r.p.m) para separação do plasma, e então ser submetido à dosagem hormonal de testosterona, LH e FSH.

As determinações hormonais de testosterona, LH e FSH foram realizadas pelo método de eletroquimioluminescência (Cobas E-411- ROCHE®).

3.7.6 Análise macroscópica e massa relativa dos órgãos

3.7.6.1 Análise macroscópica dos órgãos

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, assepsiados e, através de incisão cutânea e subcutânea, na porção medial escrotal bilateralmente, atingindo a fáscia espermática até a camada parietal da túnica vaginal, foram exteriorizados os testículos e realizada a exérese dos mesmos para posterior análise. Em seguida, outros órgãos foram retirados: coração, pulmões, baço, fígado, rins, vesícula seminal e epidídimo, e analisados quanto coloração e aspecto.

3.7.6.2 Análise da massa relativa dos órgãos

O cálculo da massa relativa dos órgãos de cada animal foi realizado dividindo-se o peso de cada órgão (g) pelo peso corporal de cada animal no dia da coleta, e

multiplicando-se o resultado por 100. O resultado está expresso em g/100g de peso vivo (g/100g p.v).

3.7.7 Avaliação funcional dos espermatozoides

3.7.7.1 Coleta do sêmen

A secreção espermática foi coletada através da dissecação do epidídimo esquerdo e direito, através de movimento de apreensão dos mesmos, no sentido cabeça-cauda. O material foi transferido para 500µL de solução fisiológica a 0,9% em placa de Petri previamente aquecida a 36°C, de acordo com a metodologia descrita por Marques e Oshio (2008). O material foi homogeneizado e motilidade, concentração, e morfologia foram verificados em microscópio óptico.

3.7.7.2 Motilidade espermática

Para esta avaliação foi utilizada a metodologia adaptada de Pereira (2017), em que 10µl de sêmen foi retirada imediatamente após se ter homogeneizado a amostra e depositada em lâmina de microscopia, recoberta com lamínula e a leitura feita em microscópio (HITACHI TM3030PLUS) no aumento de 400x. Foi realizada a contagem em duplicata, e cada lâmina de motilidade foi preparada e lida imediatamente para evitar ressecamento, sendo analisados 100 espermatozoides e tirada a média.

Avaliou-se em escala de 0 a 100% e calculou-se as porcentagens de espermatozoides com motilidade e de espermatozoides imóveis.

3.7.7.3 Concentração espermática

A concentração espermática foi verificada a partir de uma alíquota de 20 µL que foi tomada da primeira diluição e transferida para o volume de 500 µL de solução de formol salino a 10%, para imobilização dos espermatozoides. Em seguida, as áreas superiores e inferiores da câmara de Neubauer foram preenchidas com essa amostra. Adquiriu-se o número de espermatozoides pela média dos valores encontrados nos cinco quadrantes, em diagonal, de cada área (OSHIO, 2009).

Multiplicou-se o valor encontrado por $0,5 \times 5 \times 10^6$ e o valor obtido resultou no valor final em número de espermatozoides/ml, que é a unidade referencial do

espermograma (OSHIO, 2009). Apenas espermatozoides inteiros, com cabeça e cauda, foram contados.

3.7.7.4 Morfologia espermática

Na preparação da lâmina de microscopia para a análise da morfologia, foi colocada uma gota da diluição e feita à extensão com o auxílio de lâmina extensora de borda polida. A extensão foi seca ao ar e a coloração realizada foi a de Papanicolau com kit da Newprov[®], de acordo com o **Quadro 4**.

Quadro 4 - Marcha da coloração de Papanicolau de acordo com Kit NewProv[®].

Componente	Concentração	Ação
Etanol	80%	15 mergulhos
Etanol	70%	15 mergulhos
Etanol	50%	15 mergulhos
Água destilada		15 mergulhos
Hematoxilina de Harris		45 segundos
Água corrente		Até sair limpa (± 5 min)
Etanol	50%	15 mergulhos
Etanol	70%	15 mergulhos
Etanol	80%	15 mergulhos
Etanol	96%	15 mergulhos
Orange G6		1 minuto
Etanol	96%	15 mergulhos
Etanol	96%	15 mergulhos
Etanol	96%	15 mergulhos
EA 36		1:30 minutos
Etanol	96%	15 mergulhos
Etanol	96%	15 mergulhos
Etanol	96%	15 mergulhos
Etanol	96%	15 mergulhos
Xilol		15 mergulhos
Xilol		15 mergulhos
Xilol		15 mergulhos
Xilol		15 mergulhos
Verniz Vitral		Montagem

Fonte: NEWPROV (2013).

Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina sob aumento de 1000x, sendo classificados em normais ou anormais, e os defeitos investigados foram: Na cabeça (grande, pequena, afilada, piriforme, *tapered* (alongada), redonda, amorfa, vacuolizada, dupla ou qualquer combinação); na peça intermediária (amorfa, fina, grossa, longa, curta, excêntrica, implantada de forma angular); e na cauda (bicaudal, enrolada, grossa, fina, curta, longa, dobrada, quebrada, curva).

Assim, calculou-se a média dos números de células normais e de anormais encontradas nas duas lâminas (LINDER; SLOTT; SUAREZ, 1992).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas diversas análises estão expressos por média $\pm$ desvio padrão da média de cada grupo experimental. Para comparar os dados dos grupos avaliados, aplicou-se o ANOVA, seguido do teste de Tukey, com significância de 5% ($p < 0.05$). Foram analisados pelo pacote estatístico GraphPad Prism[®] (versão 5.03).

4.1 ANÁLISE DO EXTRATO

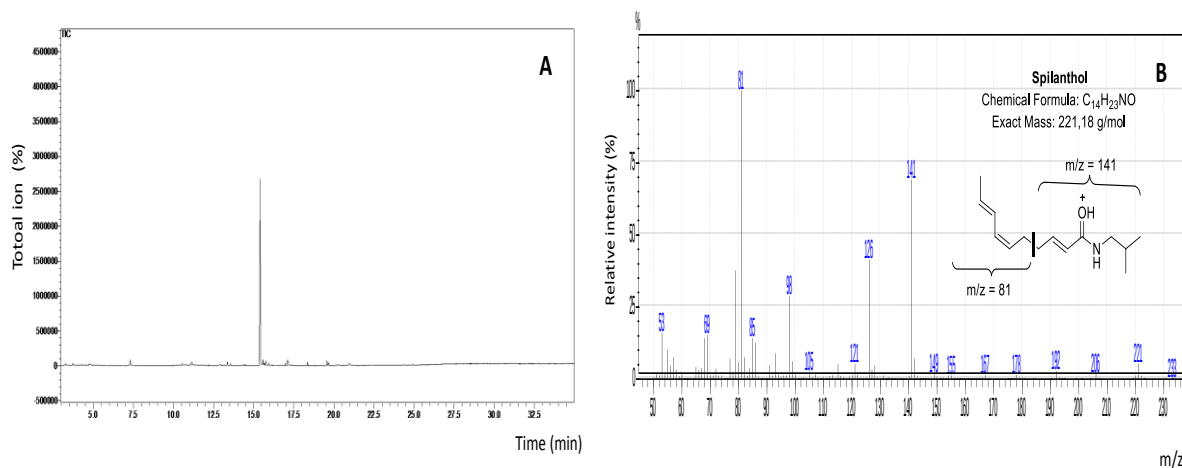
4.1.1 Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas (CG-EM)

Alquilamidas é um grupo de compostos constituídos pela união de um ácido graxo de comprimento de cadeia médio a grande, oito a dezoito carbonos, geralmente alifática, e uma amina (NAKATANI; NAGASHIMA, 1992; BOONEN et al., 2010). Dentre as famílias de plantas mais importantes, nas quais as alquilamidas se encontram presentes, destacam-se a Asteraceae, Solanaceae e Piperaceae (TORRES; CHÁVEZ, 2001).

O composto (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutyldeca-2,6,8-trienamide (espilantol) foi identificado como substância majoritária presente no extrato hidroetanólico das flores de jambu, com abundância de 84% em relação aos demais compostos presentes na amostra, pela integração dos sinais. A identificação do espilantol por impacto de elétron (70V) mostrou o aparecimento de dois sinais de fragmentação característicos, resultado da clivagem hemolítica da ligação C-C, em $m/z = 81$ (100%) e $m/z = 141$ (72%) (**Figura 7**) (HISERODT et al., 2004).

Existe muita variabilidade na detecção de espilantol nas partes de *A. oleracea*, sendo descrito maior concentração nas inflorescências seguida das folhas (RAMSEWAK; ERICKSON, 1999). Nas flores, o resultado encontrado é semelhante aos relatados por outros autores, com variações de espilantol entre 84% a 90% (BOONEN et al., 2010; CHENG et al., 2015; ANHOLETO et al., 2016).

Figura 7- Cromatograma (A) e Espectro de Massas (B) referente ao extrato hidroetanólico das flores de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen.



4.2 ESTUDO DO USO DE EHAo EM FÊMEAS

4.2.1 Sinais gerais de toxicidade

As ratas tratadas durante o pré-acasalamento, acasalamento, e pré-implantação toleraram bem a administração do EHAo, não sendo observado alterações comportamentais e sinais que indicassem toxicidade do extrato como piloereção, diarreia, alterações da atividade motora ou sangramento vaginal. Contudo os animais tratados, apresentaram excesso de salivação, sendo o efeito de rápida ocorrência, mas perdurando pelos 21 dias de tratamento (**Figura 8**).

Figura 8 - Fêmea apresentando excessiva salivação após o tratamento com EHAo.



Fonte: Autor (2017).

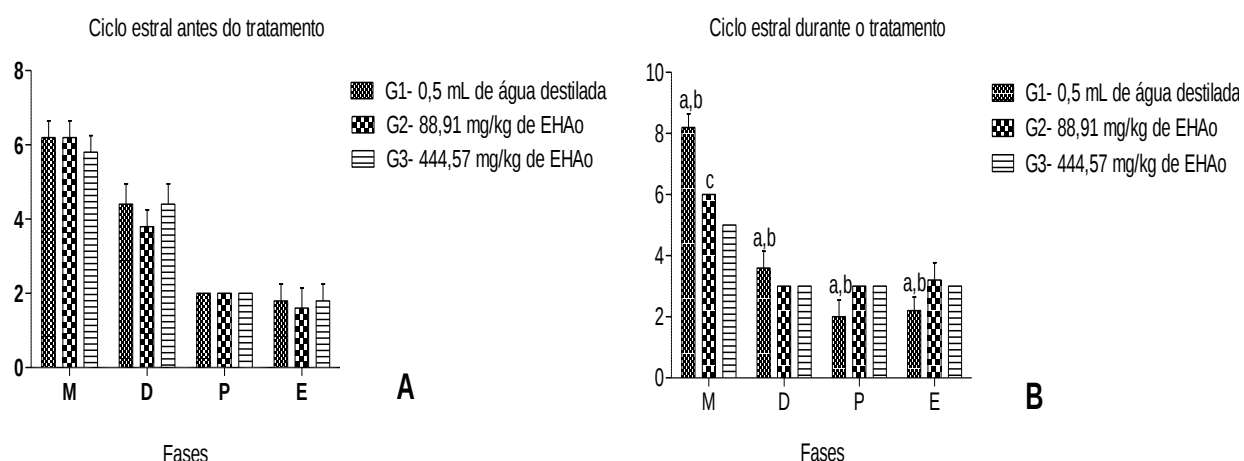
4.2.2 Avaliação do ciclo estral

A citologia vaginal é um método simples, rápido e eficaz, sendo possível observar variações dos tipos celulares vaginais, coincidente com a fase hormonal correspondente, sob influência dos hormônios esteroides estradiol e progesterona. O epitélio vaginal é responsivo as mudanças do estrógeno circulante e a citologia vaginal pode ser investigada como uma mensuração indireta das concentrações de estrógeno (GOLDMAN et al., 2007; PIMENTEL et al., 2014).

Com relação ao ciclo estral, observou-se que a frequência da fase de Proestro (P) e Estro (E) foi significativamente aumentada entre as doses de 88,91 e 444,57 mg/kg em relação ao controle. Por outro lado, as fases Metaestro (M) e Diestro (D), apresentaram redução significativa em sua frequência nos grupos tratados (**Figura 9**). No intervalo interestro (G1 (0.82 ± 0.08), G2 (0.74 ± 0.03) e G3 (0.78 ± 0.00)) e no índice de diestro (G1 (0.28 ± 0.08), G2 (0.28 ± 0.08) e G3 (0.28 ± 0.11)), não houve diferença significativa.

O M e o D são fases não férteis do ciclo, caracterizadas pela presença predominante de leucócitos, muco e redução da concentração de estradiol, progesterona, FSH e LH. O P ocorre logo após o D, de forma gradativa tem-se o pico plasmático de estrogênio que declinam rapidamente e o E corresponde à fase em que a fêmea está receptiva ao macho, sendo nesta fase observado o aumento máximo no grau de cornificação do epitélio, que resultará em altos níveis estrogênicos, especialmente se comparados ao de progesterona (BARHA; GALEA, 2010; FORTES, 2010).

Figura 9- Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de *A. oleracea* (G2 e G3), sobre o ciclo estral de ratas, linhagem Wistar, antes (14 dias) (A) e durante tratamento no período pré-acasalamento (B) (14 dias). No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey, sendo $n=5$ /grupo, onde: ^a comparação entre G1 vs G2, ^b comparação entre o grupo G1 vs G3, ^c comparação entre o grupo G2 vs G3.



O tratamento com EHAo não induziu aciclicidade, caracterizada por persistência nas fases E, D ou presença de padrão irregular com ciclos de duração prolongada. Porém, induziu a presença nas fases férteis. As mudanças possivelmente ocorreram pela presença de substâncias ativas no extrato que apresentam ação sobre o

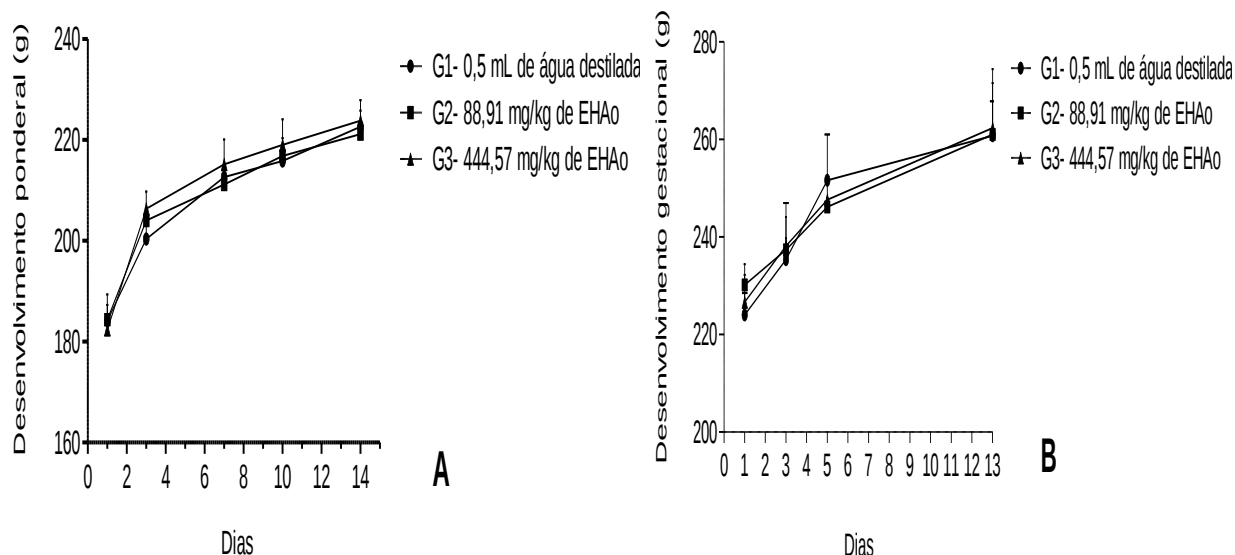
eixo hipotálamo-hipófise, produzindo regularidade na duração das fases do ciclo (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007).

4.2.3 Evolução ponderal, consumo de água e ração

A toxicidade sistêmica de substâncias pode ser avaliada não somente por modificações comportamentais, mas sobre tudo por variações no consumo alimentar, evolução ponderal, avaliação biométrica dos órgãos e alterações orgânicas visualizáveis macro e microscopicamente (VOLPATO et al., 2015).

O desenvolvimento ponderal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal (PIRES Jr et al., 2012). O tratamento com o EHAo não ocasionou qualquer alteração no desenvolvimento ponderal dos animais durante os períodos investigados, mostrando não ocasionar qualquer injúria nos organismos avaliados (**Figura 10**).

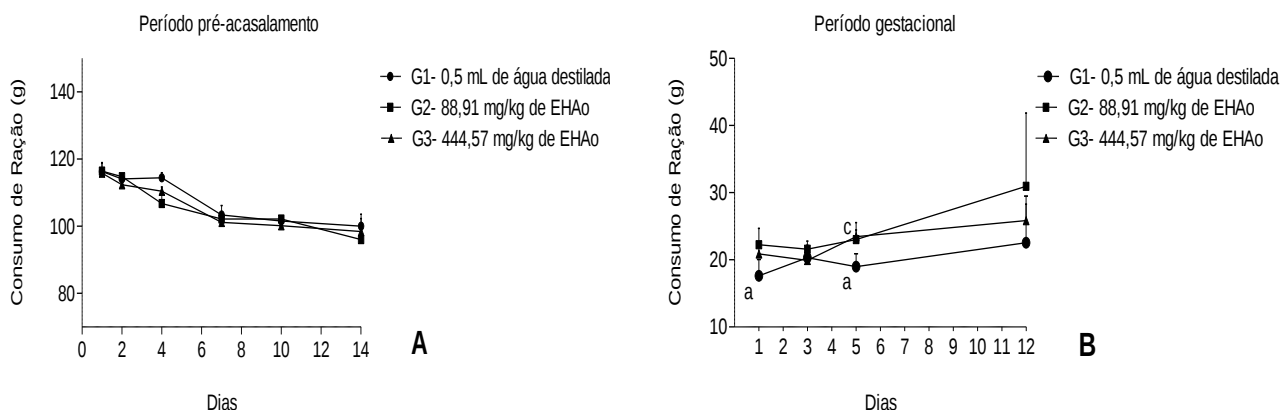
Figura 10- Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de *A. oleracea* (G2 e G3), sobre a massa (g) de ratas, linhagem Wistar, tratadas durante o período pré-acasalamento (A) (14 dias) e durante o período pré-implantação (d0-d5) e após o tratamento (d13) (B). No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey, sendo $n=5$ /grupo.



A figura 11 mostra o consumo de ração (g), dos animais durante o período pré-acasalamento (A), não apresentando diferença significativa entre os grupos avaliados

neste período. Contudo os animais tratados, apresentaram aumento do consumo no período de pré-implantação (d0-d5), gestacional (B) (**Figura 11**).

Figura 11- Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de *A. oleracea* (G2 e G3), sobre o consumo de ração (g) de ratas, linhagem Wistar, tratadas durante o período pré-acasalamento (A) (14 dias) e durante o período pré-implantação (d0-d5) e após o tratamento (d13) (B). No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey, sendo $n=5$ /grupo, onde: ^a comparação entre G1 vs G2, ^b comparação entre o grupo G1 vs G3, ^c comparação entre o grupo G2 vs G3.

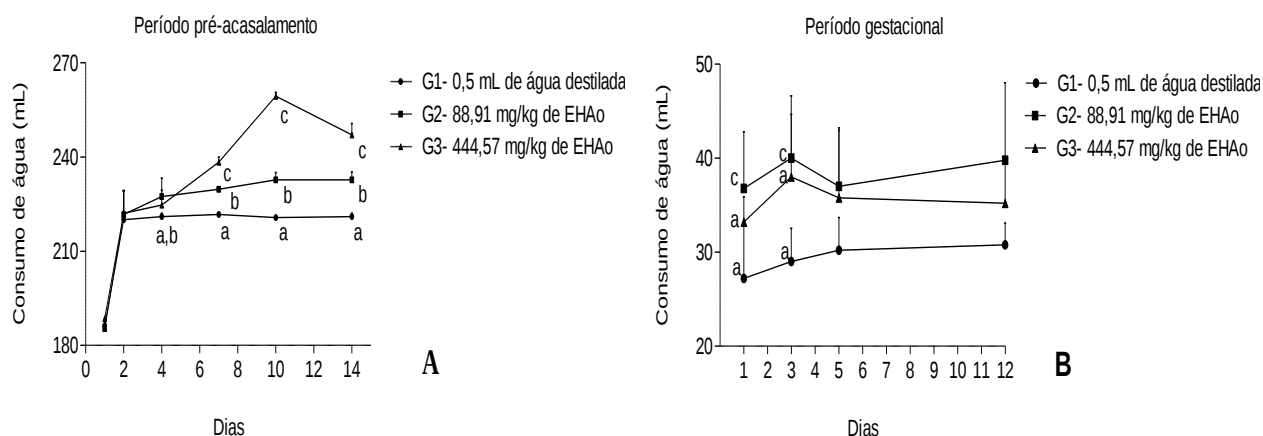


O consumo de água foi um parâmetro que se demonstrou alterado durante todo o período de tratamento (**Figura 12**). Vários fatores influenciam o consumo de água, entre eles: temperatura do ambiente, ritmo diurno, umidade, bem como limpeza ou adulteração da água com substâncias tóxicas (CAMPELL et al., 2009).

Quando a ingestão de água é reduzida, instala-se uma condição de desidratação, seguida por hiperosmolemia, falta de apetite e consequente diminuição da ingestão de alimento. Esta falta de apetite pode ser explicada devido a hiperosmolemia provocar aumento da saciedade e interferir com o termino da alimentação de forma brusca, atuando em regiões do controle hipotalâmico (WATTS; BOYLE, 2010).

Contudo, alguns autores, atribuem que na experimentação animal as alterações no consumo de água e no paladar estão relacionadas ao composto testado (CAMPBELL et al., 2009). Fato que justifica o elevado consumo de água pelos grupos tratados nos períodos de tratamentos com o EHAo, devido à presença de espilantol, já descrito com efeito de formigamento (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013).

Figura 12- Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de *A. oleracea* (G2 e G3), sobre o consumo de água (mL) de ratas, linhagem Wistar, tratadas durante o período pré-acasalamento (A) (14 dias) e durante o período pré-implantação (d0-d5) e após o tratamento (d13) (B). No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey, sendo $n=5$ /grupo, onde: ^a comparação entre G1 vs G2, ^b comparação entre o grupo G1 vs G3, ^c comparação entre o grupo G2 vs G3.



4.2.4 Índices de fertilidade e acasalamento

A fecundidade é a capacidade para a reprodução, e a fertilidade é a concretização da reprodução, avaliando no final, o número de novos indivíduos (ALMEIDA; LEMONICA, 2000). Em fêmeas a capacidade reprodutiva envolve aspectos variados de fisiologia reprodutiva: capacidade de produção de gametas adequados, produção hormonal equilibrado, alterações morfológicas e bioquímicas do oviduto e do útero compatíveis com os processos de transporte de espermatozoides, zigoto, fases precoces e tardias do desenvolvimento do conceito (GUERRA et al., 2002). Porém, muitos estudos já revelaram que plantas são agentes uteis para fins de anti-fertilidade tanto em roedores como em humanos (MUKHERJEE; MITRA, 2009; KUMAR; MISHRA, 2011).

A administração do EHAo não interferiu no acasalamento das ratas e para todas as ratas acasaladas verificou-se a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal (índice de acasalamento de 100%), e 100% das fêmeas apresentaram implantes, tais características sugerem o EHAo não apresenta efeitos contraceptivos. Não foi

encontrado diferença estatisticamente significativa no número de corpos lúteos, implantações e perda pré-implantação (**Tabela 1**).

A avaliação do EHAo sobre o desenvolvimento gestacional em ratas foi realizada a partir da administração oral durante o período pré-implantação. Várias espécies vegetais podem interferir nesse período de prenhes promovendo aumento da perda de pré-implantação, retardo do desenvolvimento, morte fetal e malformações (GOONASEKERA et al., 1995; ALMEIDA; LEMONICA, 2000; LEITE et al., 2004).

Tabela 1- Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado a partir das flores de *A. oleracea* (G2 e G3), sobre as variáveis reprodutivas de ratas com prenhes interrompida ao 13º dia de gestação.

Variáveis	Grupos		
	G1- 0,5 mL de água destilada (n=5)	G2- 88,91 mg/kg de EHAo (n=5)	G3- 444,57 mg/kg de EHAo (n=5)
Fêmeas acasaladas (n)	05	05	05
Fêmeas com implantes (n)	05/05	05/05	05/05
Índice de acasalamento (%)	100%	100%	100%
Útero gravídico (g)	2.95±0.5	3.25±1.4	5.09±1.7
Corpos lúteos (n)	9.2±0.4	10.8±1.0	10.6±1.9
Implantes (n)	7.3±2.9	7.6±3.8	11.8±1.4
Índice de implantação	102.22±32.77	82.47±43.85	100±5.44
Perdas pré-implantações	24.44±18.26	37.17±35.32	11.50±16.92

Os valores representam a média ± D.P.M (n=5/grupo). ANOVA uma via (Tukey) (p <0.05).

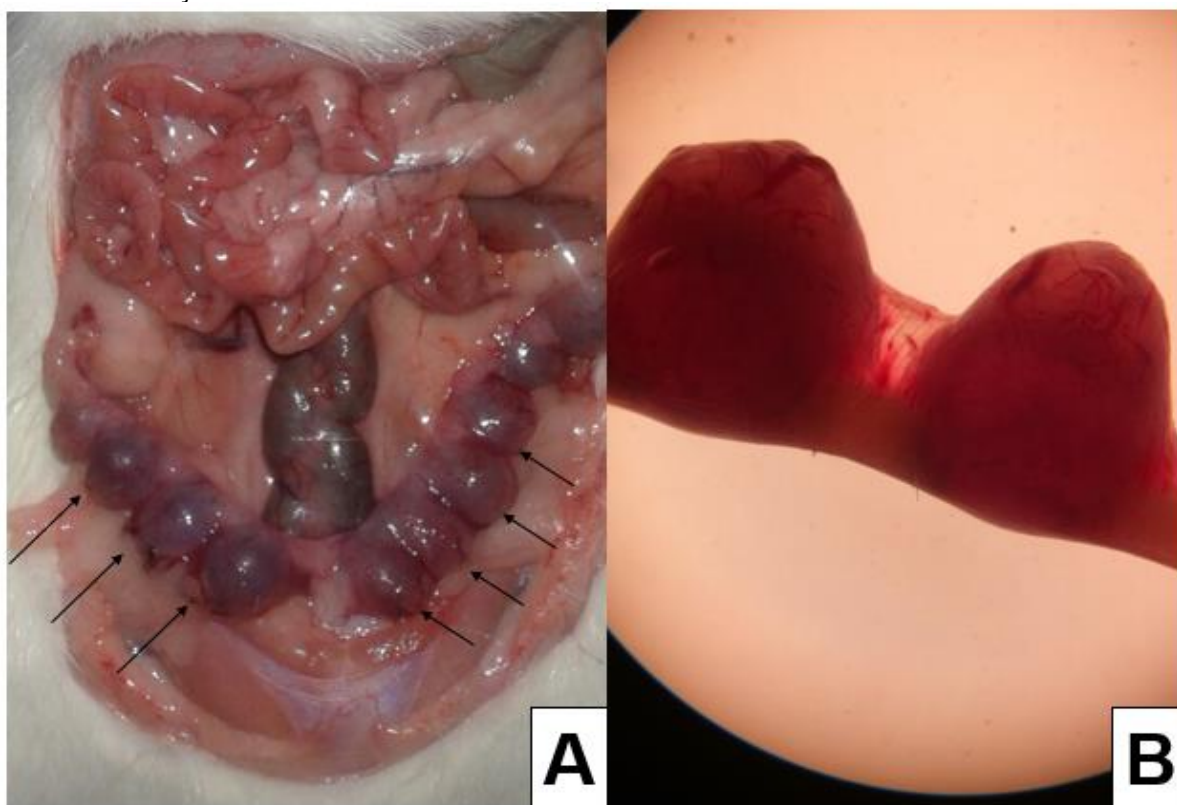
O embrião até originar o blastócito, passa por sucessivas mitoses. E a implantação do blastocisto corresponde a um processo complexo incluindo proliferação das células endometriais, decidualização e aumento do fluxo sanguíneo (DIMITRIADIS; MENKHORT, 2010). Contudo, substâncias citotóxicas interrompem a gestação possivelmente interferindo com a divisão mitótica dos fetos, já substâncias químicas, interferem antes e após o processo de implantação podendo resultar em perda embrionária pré e pós-implantação (YAKUBU; BUKOYE, 2009).

Após implantado, o embrião pode continuar seu desenvolvimento normal, apresentar um desenvolvimento anormalmente ou ainda morrer. Quando ocorre a morte do embrião, observa-se a reabsorção, que é caracterizada como lise “*in situ*” do embrião ou feto (MAGANHA et al., 2006). Portanto, a reabsorção é indicativa de falha do

desenvolvimento do embrião, podendo ser devido a falha na função do revestimento uterino ou toxicidade materna (YAKUBU; BUKOYE, 2009).

O índice de implantação, índice de reabsorção e perda pré-implantação são parâmetros importantes para avaliar o número de blastocitos implantado no útero e no subdesenvolvido (ALMEIDA; LEMONICA, 2000; CHANG et al., 2002) (**Figura 13**). Em nosso estudo, a ausência de alterações nesses índices, indicam que o EHAo não apresenta efeito tóxico sobre o desenvolvimento embrionário antes da implantação, que possa provocar a perda do embrião conforme observaram Kong e colaboradores (1989) com a espécie *Ruta graveolens* L. (KONG et al., 1989) e Ugwah-Oguejiofor et al. (2011), com a espécie *Ficus platyphylla*.

Figura 13: Em **A**: cesária de rata apresentando embriões nos cornos uterinos (seta), e em **B**: visualização dos embriões com 13 dias de desenvolvimento.



Fonte: Autor (2017).

4.2.5 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

As determinações hematológicas e bioquímicas sanguíneas são importantes para prever a influência da substância teste sobre a homeostase e o estado das funções hepática e renal (OECD, 2001; VÁZQUEZ; GUERREIRO, 2007). Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram mensurados neste estudo no décimo terceiro dia de

prenhes (d13), correspondendo em oito dias após o fim do período de tratamento com EHAo.

Quanto aos resultados bioquímicos demonstraram que os grupos tratados (G2 e G3) em relação ao grupo controle (G1), apresentaram aumento significativo ($p < 0.5$) nos níveis de triglicerídeos, colesterol total e frações (**Tabela 2**).

Tabela 2- Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado a partir das flores de *A. oleracea* sobre o perfil bioquímico de ratas com prenhes interrompida ao 13º dia de gestação

Parâmetros	Grupos		
	G1- 0,5 mL de água destilada (n=5)	G2- 88,91 mg/kg de EHAo (n=5)	G3- 444,57 mg/kg de EHAo (n=5)
Triglicerídeos (mg/dL)	72.75±15.16 ^b	76.4±18.13 ^C	169.4±17.64
Colesterol Total (mg/dL)	27.25±5.44 ^b	32.6±2.60 ^C	44.6±2.60
Colesterol HDL (mg/dL)	18.75±3.30 ^b	23.4±1.10 ^C	31.8±4.02
Colesterol LDL (mg/dL)	6.45±1.79 ^b	5.79±2.88 ^C	34.6±3.35
Glicose (mg/dL)	135.25±4.93	136.2±3.67	137.4±3.34
Ureia (mg/dL)	35.25±4.64	33.4±7.44	33±8.21
Creatinina (mg/dL)	0.3±0.04	0.4±0.17	0.5±0.19
ALT (U/L)	40.5±24.61	34.8±19.88	33.2±10.40
AST (U/L)	142±10.23	96.2±67.82	102.6±30.12
FAL (U/L)	53±16.95	53.8±17.63	54.4±17.67
GGT (U/L)	3.5±0.57	3.6±3.39	3.8±3.56

Os valores estão expressos em média ± D.P.M (n=5/grupo). ANOVA uma via (Tukey) ($p < 0.05$). Onde: ^a comparação entre G1 vs G2, ^b comparação entre o grupo G1 vs G3, ^c comparação entre o grupo G2 vs G3.

De acordo com a avaliação dos parâmetros bioquímicos que indicam alterações na função renal e hepática (**Tabela 2**), não houve diferença significativa entre os níveis de ureia e creatinina, assim como para os valores das enzimas transaminases (ALT e AST), ALP e GGT que indicam integridade da função hepática (OECD, 2001; VÁSQUEZ; GUERRERO, 2007; SÁ et al., 2015). Estes resultados indicam que o tratamento com EHAo nas condições experimentais, não foi capaz de causar danos renais e hepáticos.

As alterações apresentadas, nesse estudo, não comprometeram a fisiologia orgânica dos animais tratados, estando dentro dos valores de referência para o sexo e idade (GIKNIS; CLIFFORD, 2008). Contudo, devido à escassez de estudos e pela relevância clínica de tais achados produzidos pelo EHAo deve-se verificar com estudos mais extensivos o envolvimento de alquilamidas (espilantol) no aumento de lipídeos.

Ainda de acordo com os valores médios da função renal, os parâmetros bioquímicos avaliados não apresentaram diferença mínima significativa ($P > 0,05$), para os

níveis de ureia e creatinina. Assim como para os valores médios da função hepática, avaliada mediante a atividade das enzimas (U/L) que avaliam a integridade do fígado, após as fêmeas terem sido submetidas ao tratamento com o EHAo (**Tabela 2**).

A análise dos parâmetros sanguíneos é de grande importância para a avaliação de risco e as mudanças no sistema hematológico têm grande valor preditivo para a toxicidade humana, quando os dados são convertidos de estudos com animais (OLSON et al., 2000). No presente estudo, o tratamento com EHAo não alterou o perfil hematológico. As diferenças estatísticas encontradas no número de neutrófilos (G1 vs G3), encontram-se dentro do intervalo de referência descrito para a espécie e faixa etária (GIKNIS; CLIFFORD, 2008) o que sugere que esta variação não apresenta importância clínica (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado a partir das flores de *A. oleracea* sobre o perfil hematológico de ratas com prenhes interrompida ao 13º dia de gestação.

Parâmetros	Grupos		
	G1- 0,5 mL de água destilada (n=5)	G2- 88,91 mg/kg de EHAo (n=5)	G3- 444,57 mg/kg de EHAo (n=5)
Leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$)	6.618 $\pm$ 1.22	6.464 $\pm$ 1.99	6.768 $\pm$ 0.50
Neutrófilos (%)	28.05 $\pm$ 5.02 ^b	22.07 $\pm$ 13.24	11.15 $\pm$ 0.50
Linfócitos (%)	71.4 $\pm$ 4.53	77 $\pm$ 12.79	88.75 $\pm$ 0.50
Monócitos (%)	0.03 $\pm$ 0.42	0.03 $\pm$ 0.22	0.02 $\pm$ 0.00
Eosinófilos (%)	0.11 $\pm$ 0.07	0.13 $\pm$ 0.22	0.10 $\pm$ 0.00
Basófilos (%)	0.10 $\pm$ 0.14	0.25 $\pm$ 0.25	0.00 $\pm$ 0.00
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	8.23 $\pm$ 0.85	7.78 $\pm$ 0.41	8.69 $\pm$ 0.25
HGB (g/dL)	14.94 $\pm$ 2.05	14.2 $\pm$ 0.70	15.6 $\pm$ 0.70
HCT (%)	46.6 $\pm$ 6.37	45.35 $\pm$ 2.42	47.9 $\pm$ 0.57
VCM (fL)	56.55 $\pm$ 1.91	57.1 $\pm$ 0.94	56.5 $\pm$ 0.98
HCM (pg)	18.1 $\pm$ 0.57	18.15 $\pm$ 0.41	17.95 $\pm$ 0.35
CHCM (g/dL)	33.05 $\pm$ 0.07	33.23 $\pm$ 0.22	33.25 $\pm$ 1.21
RDW	13.4 $\pm$ 0.85	13 $\pm$ 0.54	12.5 $\pm$ 0.28
PLT ($10^9/\text{L}$)	857 $\pm$ 28.28	1018 $\pm$ 28.92	1108 $\pm$ 28.29

Os valores estão expressos em média $\pm$ D.P.M (n=5). ANOVA uma via (Tukey) (p <0.05). HGB (Hemoglobina), HCT (Hematócrito), VCM (Volume corpuscular médio), HCM (Hemoglobina corpuscular média), CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média), RDW (Coeficiente de variação do VCM), PLT (Plaquetas). Onde: ^a comparação entre G1 vs G2, ^b comparação entre o grupo G1 vs G3, ^c comparação entre o grupo G2 vs G3.

4.2.6 Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos

Em ensaios não clínicos de toxicidade reprodutiva, o monitoramento da função de órgãos vitais de animais tratados com determinada substância é importante, pois alterações nesses órgãos podem comprometer o processo reprodutivo (BAILEY et al., 2004; WOLFSEGGGER et al., 2009). Não foi evidenciado qualquer alteração macroscópica dos órgãos vitais e reprodutores que pudessem sinalizar alguma injúria ocasionada pelo EHAo, considerando os parâmetros: cor, textura, tamanho e forma. Assim como nenhuma redução significativa foi observada no peso relativo destes órgãos (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado a partir das flores de *A. oleracea* sobre o peso relativo dos órgãos de ratas com prenhes interrompida ao 13º dia de gestação.

Órgão (g)	Grupos		
	G1- 0,5 mL de água destilada (n=5)	G2- 88,91 mg/kg de EHAo (n=5)	G3- 444,57 mg/kg de EHAo (n=5)
Baço	0.2997 ± 0.02	0.2896 ± 0.03	0.2960 ± 0.03
Coração	0.4029 ± 0.04	0.3820 ± 0.06	0.3769 ± 0.03
Fígado	3.5988 ± 0.74	3.3701 ± 0.38	3.2330 ± 0.36
Pulmão	0.4836 ± 0.05	0.5187 ± 0.12	0.5230 ± 0.07
Rins	0.6841 ± 0.05	0.7119 ± 0.03	0.7252 ± 0.05
Ovários	1.140 ± 0.03	1.565 ± 0.03	1.2066 ± 0.16
Canal vaginal	0.4627 ± 0.09	0.4492 ± 0.08	0.3585 ± 0.03

Os valores estão expressos em média ± D.P.M (n=5/grupo). ANOVA uma via (Tukey) (p <0.05).

4.2.7 Microscopia dos ovários

Os resultados histopatológicos dos ovários (**Figura 14**) mostraram que o tratamento com EHAo não foi capaz de promover alterações estruturais neste órgão que é responsável pela produção de fatores de crescimento, hormônios e produção de gametas femininos potencialmente fertilizáveis (MILLER; AUCHUS, 2011; BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012; VICKERY; LUNENFELD, 2013).

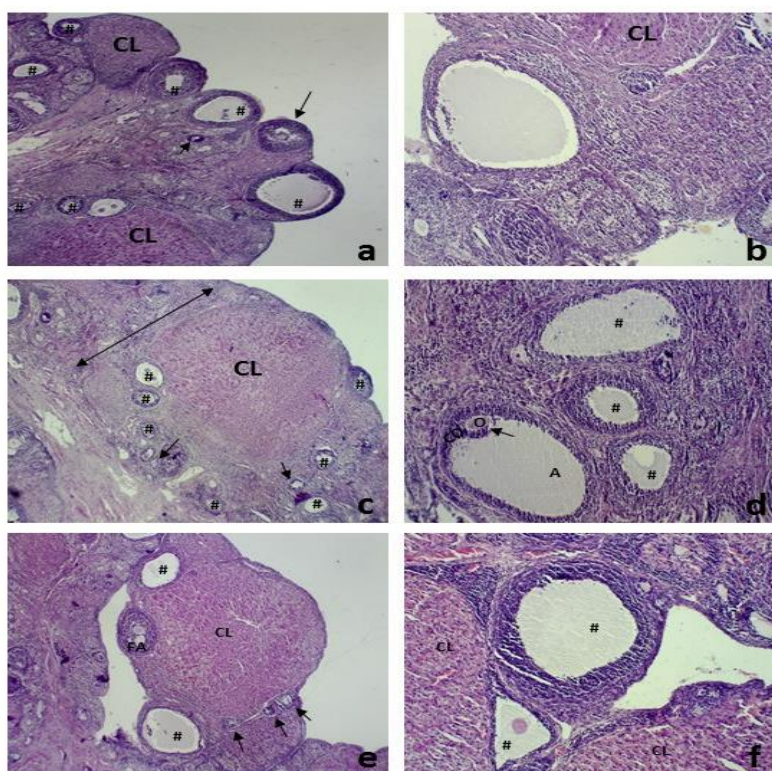
A função reprodutora em mulheres requer a integração de sinais hormonais proveniente do hipotálamo, hipófise e ovários (VANPUTTE et al., 2016). A foliculogênese é um processo de formação, crescimento e maturação folicular. Os folículos ovarianos consistem em um ovócito e uma camada epitelial circunjacente de células da teca e granulosa, que se desenvolvem durante a vida intrauterina até a menopausa (HANSEN, 2015).

Nas fotomicrografias histológicas podem ser observados folículos em desenvolvimento (primordiais, secundários, antrais, pré-ovulatório), corpos lúteos e na região medular as células intersticiais. Estas observações demonstram que o tratamento com o EHAo não interferiu na foliculogênese (DEVOTO et al., 2009; HANSEN, 2015). Ressalta-se que apesar de muitos folículos serem ativados, somente uma pequena porcentagem é capaz de desenvolver-se até a ovulação, pois, grande parte sofre atresia (CORTVRINDT; SMITZ, 2001; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; JAHROMI et al., 2015).

Neste estudo, não houve aciclicidade ovariana e alterações no desenvolvimento folicular, sugerindo que o EHAo não interferiu na quantidade e liberação de androgênios (WALTERS; ALLAN; HANDELSMAN, 2012; LIU et al., 2015). Não foi observado ainda danos foliculares indicativos de infertilidade temporária (primários, secundários e antrais), nem infertilidade permanente (folículos primordiais) (VANPUTTE et al., 2016).

Em estudos utilizando extrato de *Myracrodruon urundeuva* Allem., também foi observado resultados em que não houve influência no ciclo estral e no desenvolvimento folicular (OLIVEIRA et al., 2016). Em outro estudo com a espécie *Senecio bialfræ* também da família Asteraceae usada na farmacopeia africana para o tratamento de muitas doenças entre as quais a infertilidade, demonstrou que os parâmetros bioquímicos e fisiológicos da fertilidade foram significativamente melhorados (LIENOU et al., 2015).

Figura 14 - Fotomicrografias de cortes histológico de ovários de ratas wistar em secção transversal, H.E. Nota-se: **a)** presença de folículo ovariano primordial (seta pequena), folículos em pleno desenvolvimento (#), presença de folículo antral em desenvolvimento (seta grande) e presença de corpo lúteo (CL) (G1-Grupo Controle) (100x). **b)** observar região bem preservada, com presença de corpo lúteo (CL) e folículo em desenvolvimento (#) (G1- Grupo Controle) (400x). **c)** na região cortical (seta dupla), observar a presença de folículos primordiais (setas), de folículos em desenvolvimento (#) e presença de corpo lúteo (CL) (G2- Grupo Tratado I, Dose 88,91) (100x). **d)** presença de folículo secundário ou antral bem desenvolvido (ovócito (O), *cumulus oophorus* (CO), corona radiada (seta), antro folicular (A)) e de folículos em desenvolvimento (#) (G2- Grupo Tratado I, Dose 88,91) (400x). **e)** observar região cortical e presença de folículos ovarianos primordiais (setas), de folículos em desenvolvimento (#), de folículo antral (FA) e presença de corpo lúteo (CL) (G3- Grupo Tratado II, Dose 444,57) (100x). **f)** presença de folículos em desenvolvimento (#) e observar corpo lúteo (CL) (G3- Grupo Tratado II, Dose 444,57) (400x).



4.3 ESTUDO DO USO DE EHAO EM MACHOS

4.3.1 Sinais gerais de toxicidade

Durante os procedimentos experimentais, nenhuma morte, alteração da atividade locomotora, piloereção ou qualquer outro sinal de clínico de toxicidade foram observados no grupo controle e tratados com as diferentes doses do EHAo.

4.3.2 Avaliação da massa ponderal, consumo de água e ração

Os dados obtidos mostram que a administração do EHAo nas doses de 88,91 mg/kg e 444,57 mg/kg não provocou alteração significativa no peso corporal dos ratos (**Figura 15**), na ingestão de água (**Figura 16**) e ração (**Figura 17**) ($p>0,05$), contudo, percebe-se redução destes últimos parâmetros no decorrer do tempo de avaliação em todos os grupos deste estudo.

A ausência de alterações nos parâmetros avaliados e em sinais de toxicidade indicam que o EHAo não representa risco de toxicidade sistêmica, o que foi já constatado por vários pesquisadores que trabalharam com diferentes extratos e doses (CHAKRABORTY et al., 2004; CHAKRABORTY et al., 2010; NOMURA et al., 2013).

Figura 15- Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de *A. oleracea* (G2 e G3), sobre o desenvolvimento (g) de ratos, linhagem Wistar, tratados durante 30 dias. No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0,05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey.

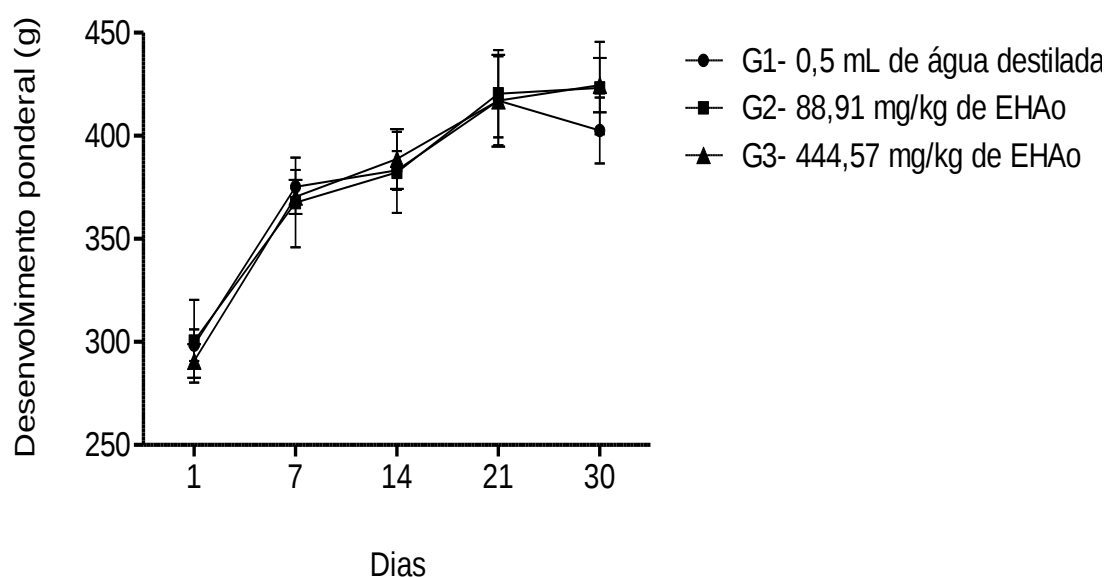


Figura 16 - Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de *A. oleracea* (G2 e G3), sobre o consumo de água (mL) de ratos, linhagem Wistar, tratados durante 30 dias. No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey.

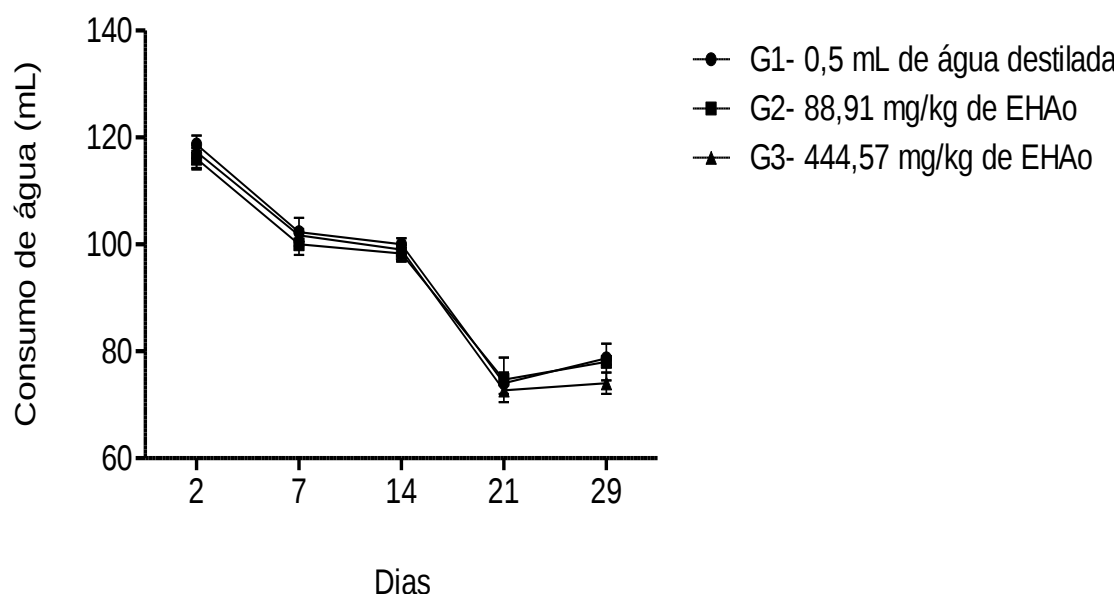
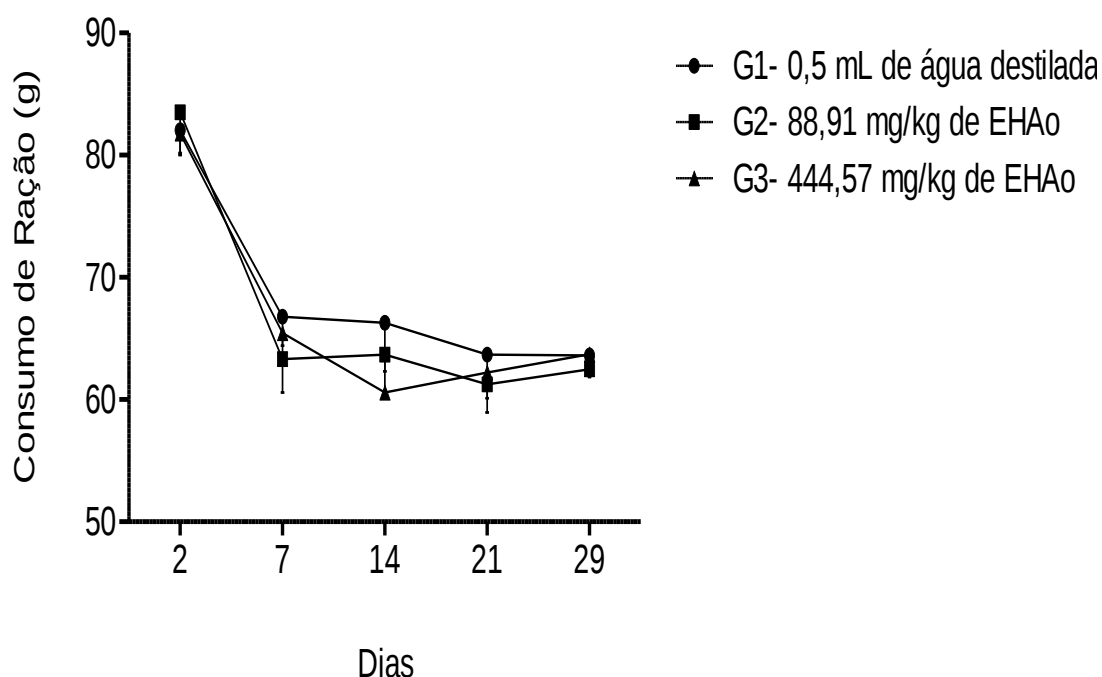


Figura 17- Efeito do tratamento por via oral com EHAo, preparado das flores de *A. oleracea* (G2 e G3), sobre o consumo de ração (g) de ratos, linhagem Wistar, tratados durante 30 dias. No grupo G1 foi administrado água destilada (0,5 mL/ animal). Os valores representam a média $\pm$ D.P.M ($p < 0.05$). Foi aplicado teste ANOVA, seguido do teste Turkey.



4.3.3 Avaliação de parâmetros sexuais

Todos os protocolos experimentais foram realizados na fase escuro do ciclo claro/escuro, a fim de promover condições semelhantes os testes (AGMO, 1997).

4.3.3.1 Teste de motivação sexual

No Teste de motivação sexual alguns estudos têm demonstrado que uma rata, sexualmente receptiva, pode ativar diferentes comportamentos de aproximação em ratos sexualmente experientes, estes ratos, permanecem por mais tempo na proximidade da fêmea receptiva quando observados em uma área que impede o comportamento copulatório (AGMO, 2003). No entanto, para ratos inexperientes é necessário que estes sejam familiarizados com a arena de avaliação, sem a presença de animais iscais, tornando a fêmea um estímulo incondicionado para o rato, o que independe de sua experiência.

A motivação sexual é ativada por estímulos externos, iniciados no SNC e não por eventos endógenos, sendo traduzidos em comportamentos de fácil observação, na musculatura esquelética, podendo ou não, estar associada com alterações no Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (AGMO, 1999; AGMO, 2007).

No teste de motivação sexual os ratos sexualmente inexperientes foram expostos a um incentivo sexual (fêmea receptiva) e a um incentivo social (masculino). Todos os animais, escolheram permanecer por mais tempo no incentivo das fêmeas sexualmente receptivas, e com maior duração, decorridos os 30 minutos de observação (Tabela 5).

Tabela 5- Média $\pm$ D.P.M do tempo, em minutos (min) para cada um dos grupos do teste de motivação sexual observado durante 30 min em ratos machos tratados durante 30 dias com EHAo, preparado a partir das flores de *A. oleracea*.

Parâmetros	G1- 0,5 mL de água destilada (n=5)	G2- 88,91 mg/kg de EHAo (n=5)	G3- 444,57 mg/kg de EHAo (n=5)
Frequência FSR	19.4 $\pm$ 0.8	21.4 $\pm$ 6.6	22 $\pm$ 3.7
Duração FSR	20.2 $\pm$ 1.0	18.8 $\pm$ 1.0	18.4 $\pm$ 1.6
Frequência MSA	20.8 $\pm$ 1.0	21.2 $\pm$ 2.6	20.4 $\pm$ 3.2
Duração MAS	6.4 $\pm$ 0.5	7.6 $\pm$ 0.5	7.0 $\pm$ 1.0
RG	0	0	0
ND	4.0 $\pm$ 0.0	5.2 $\pm$ 1.6	4.0 $\pm$ 0.0
Tempo total (min)	30	30	30

Onde: FSR = fêmea sexualmente receptiva; MSA = macho sexualmente ativo; RG = manipular ou lambear a região genital; ND = tempo restante (comportamentos não avaliados).

4.3.3.2 Teste de ereção peniana

A população faz uso de plantas medicinais como *Montanoa tomentosa*, *Syzygium aromaticum*, *Massularia acuminata*, *Fadogia agrestis* e *Panax ginseng* para o tratamento de disfunções sexuais, principalmente em casos de incapacidade de se alçar e manter o pênis ereto para que ocorra a relação sexual satisfatória (KIM et al., 1998; KUMAR; SUBRAMONIAM; PUSHPANGADAN, 2000; ANDRADE et al., 2007; AMANG et al., 2014).

A atividade afrodisíaca destas espécies é atribuída à presença de um ou mais fitoconstituintes como esteróis, fenóis, alcaloides, aminoácidos e saponinas, que atuam intensificando a liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais ou neurais, resultando no relaxamento dos corpos carvenosos, melhorando o desempenho sexual, e assim, melhorando o funcionamento dos órgãos genitais (NDENECHO, 2009; SHAMLOUL, 2010; MALVIYA et al., 2011; MELNYK; MARCONE, 2011). No caso da espécie *Panax ginseng* C. A. Meyer, da família Araliaceae, o efeito é devido a presença de ginsenosídeos (NOCERINO et al., 2000; MURPHY; LEE, 2002; ANDRADE et al., 2007).

Na população de animais estudada, o EHAo não foi capaz de ocasionar o aumento na ereção peniana de machos sexualmente inexperiente, diferença não significativa, quando comparada ao grupo controle no período de registro (30 minutos), sendo observada ereção peniana em todos os animais dos grupos analisados. Do mesmo modo, os resultados mostraram não ter diferença na média de ereções de cada grupo e no índice de ereção peniana (IEP) (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Média $\pm$ D.P.M para cada um dos grupos do teste de ereção peniana em ratos machos, observado durante 30 minutos, tratados com EHAo preparado a partir das flores de *A. oleracea*.

Parâmetros	G1- 0,5 mL de água destilada (n=5)	G2- 88,91 mg/kg de EHAo (n=5)	G3- 444,57 mg/kg de EHAo (n=5)
Animais com EP (n)	5	5	5
Média de ereções	20.8 $\pm$ 0.7	20.6 $\pm$ 0.5	21 $\pm$ 0.6
IEP (%)	64,9%	64%	66%
Tempo total (min)	30	30	30

Onde: EP= Ereção Peniana; IEP = Índice de Ereção Peniana.

Em nossos experimentos, era esperado que animais tratados com o EHAo apresentassem precocemente a primeira ereção e o maior número de ereções dentro do

período observado, certo que esta planta, é indicada como estimulante sexual, e possui em sua composição fitoconstituintes como saponinas, fenóis e alcaloides que melhoram a atividade do sistema reprodutor masculino (MELNYK; MARCONE, 2011; PINHEIRO et al., 2015).

4.3.3.3 Teste de comportamento sexual

Dentre os parâmetros de comportamento sexual masculino calculado, houve aumento significativo na frequência de montagem nas doses de 88,91 mg/kg e 444,57 mg/kg de extrato em comparação ao grupo controle. Isto é indicativo de aumento da libido, de eficiência da ereção e orientação do pênis (AGMO, 1997) (**Tabela 7**).

A latência para monta e intromissão, também ditos apetitivos, não foram alterados sugerindo que todos os animais apresentaram orientação heterossexual, reforçado pelos resultados de motivação sexual, possivelmente devido a não alteração dos hormônios da pituitária anterior que estimulam a síntese do receptor de dopamina (ALLOUH et al., 2014; ALLOUH, 2015).

Não houve também potência do comportamento sexual, ou seja, em parâmetros consumatórios, no caso no comportamento de ejaculação (n=0), provavelmente, não decorreu de redução na ereção peniana, pois o número de montas com intromissão não foi modificado nos grupos tratados. E mesmo que o órgão copulador masculino esteve em contato com o orifício vaginal, não houve ativação ou reforço da lordose das fêmeas (AMANG et al., 2014).

Tabela 7- Média $\pm$ D.P.M dos parâmetros comportamentais em minutos (min) de ratos machos tratados durante 30 dias com EHAo, preparado a partir das flores de *A. oleracea*, observados durante 30 minutos.

Parâmetros	G1- 0,5 mL de água destilada	G2- 88,91 mg/kg de EHAo	G3- 444,57 mg/kg de EHAo
Comportamento de Montagem			
FM	6.0 $\pm$ 2.3 ^{a,b}	15.4 $\pm$ 0.5	14.6 $\pm$ 0.5
LM	4.0 $\pm$ 3.3	2.85 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.0
Comportamento de Penetração			
LP	Aus.	Aus.	Aus.
FP	Aus.	Aus.	Aus.
Comportamento de ejaculação			
FE	Aus.	Aus.	Aus.
IPEJ	Aus.	Aus.	Aus.

Onde: FM = Frequência de montagem; LM = Latência de montagem; LP = Latência de Penetração; FP = Frequência de Penetração; FE= Frequência de ejaculação; IPEJ= Intervalo pós-ejaculatório. Aus.= Ausente

O número de intromissões seguidos de ejaculações é considerado importante na fertilidade, já que um maior número de ejaculações eleva o número de espermatozoides no canal vaginal, aumentando as chances de fertilização (HULL; WOOD; McKENNA, 2006).

Nchegang et al. (2016), observou que o extrato de *Eremomastax speciosa* (Acanthaceae), administrado por duas semanas na dose de 500mg/kg, teve efeitos positivos na motivação e desempenho sexual masculino. Allouh et al., (2015), relatou que os tuberculos da espécie *Cyperus esculentus* têm atividade afrodisíaca, por aumentar a libido e o desempenho sexual masculino.

No estudo conduzido por Estrada-Reys et al. (2013), o tratamento com a espécie *Turnera diffusa* Wild reduziu principalmente a latência da ejaculação, confirmando os efeitos pró-sexual da espécie, e o efeito ansiolítico de é uma vantagem para seu uso para melhorar o desempenho sexual. Testou-se também o potencial afrodisíaco do caule de *Fadogia agrestis* (Rubiaceae) em ratos machos, e em todas as doses administradas observou-se aumento na frequência de montagem, de penetração e prolongamento da latência ejaculatória (MALVIYA et al., 2011).

Mohammed e Engidawork (2011) investigaram o efeito do extrato fresco de *Catha edulis* (Celestraceae), uma erva com atividade estimulante sobre a sexualidade, sobre os parâmetros reprodutivos, incluindo motivação sexual. Os resultados demonstraram que a dose de 100mg/kg, melhorou a motivação sexual, sem apresentar efeito sobre o desempenho. Semelhante aos dados obtidos neste estudo, sugerindo que a espécie *Acmella oleracea* possibilita aumento da libido, sem alterar o comportamento heterossexual.

4.3.4. Teste de dominância letal

4.3.4.1 Variáveis reprodutivas

As variáveis reprodutivas das ratas não tratadas, acasaladas com os animais tratados, encontram-se na tabela 8. A administração do EHAo não interferiu no acasalamento dos ratos (taxa de acasalamento e índice de fertilidade de 100%), assim, a proporção de fêmeas grávidas e a duração da gravidez também não foram afetadas em nenhuma das doses estudadas, obtendo o número de filhotes, G1= 53, G2= 50 e G3= 26.

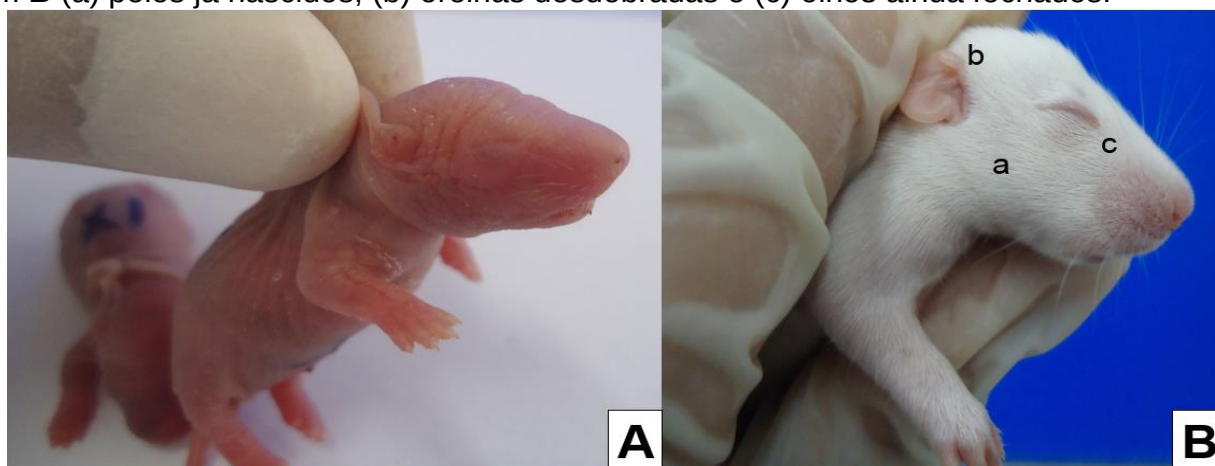
Tabela 8- Variáveis reprodutivas de progenitoras, acasaladas com os ratos machos, tratados durante 30 dias com EHAo, preparado a partir das flores de *A. oleracea*.

Parâmetros das Progenitoras	Grupos		
	G1- 0,5 mL de água destilada (n=5)	G2- 88,91 mg/kg de EHAo (n=5)	G3- 444,57 mg/kg de EHAo (n=5)
Nº de ratas acasaladas	5	5	5
Nº de fêmeas com TP.	5(5)	5(5)	5(5)
Nº de fêmeas prenhas	5(5)	5(5)	5(5)
Nº de filhotes/prog.	10.6±0.55(53) b	10±0.70(50) c	5,2±1,92(26)
Peso da ninhada (g)	6.59±0.56	6.60±0.36	6,96±0,83
Nº de filhotes fêmeas	5.8±0.84(29)	5.4±1.14(27)	4±1,22(26)
Nº de filhotes machos	4.8±0.45(24) b	4.6±0.55(23) c	1,2±1,10(6)
Taxa de acasalamento	100%	100%	100%
Índice de fertilidade	100%	100%	100%
Índice de virilidade	45.3% b	46% c	30%

TP: tampão vaginal (espermatozoides), Prog.= Progenitora. Os valores estão expressos em porcentagens e em média ± D.P (n=5). ANOVA uma via (Tukey) (p <0.05). Onde: ^a comparação entre G1 vs G2, ^b comparação entre o grupo G1 vs G3, ^c comparação entre o grupo G2 vs G3.

No primeiro dia pós-natal, os filhotes foram contados, sexados, mensurado o peso dos filhotes individualmente e observadas as características macroscópicas externas dos filhotes. A exposição ao EHAo revelou que o mesmo não demonstrou sinais de fetotoxicidade, expressadas pelo número de nascidos, malformações externas e peso da ninhada (G2 e G3) (**Figura 18**). Embora não se tenha observado alteração na fertilidade, houve uma drástica redução no número médio de filhotes do G3 (444,57 mg/kg) em relação aos demais grupos avaliados (G1 e G2) (p<0.001) respectivamente, quando machos expostos foram submetidos ao convívio com fêmeas não expostas. Devido a diferença estatística no número de machos nascidos, houve redução no índice de virilidade do grupo G3.

Figura 18- Em **A** filhote recém-nascido, apresentando-se sem pelos e orelhas dobradas e em **B** (a) pelos já nascidos, (b) orelhas desdobradas e (c) olhos ainda fechados.



Fonte: Autor (2017).

Além disso, foi avaliado o reflexo de endireitamento, onde cada animal foi colocado em decúbito dorsal e verificado o tempo gasto para retornar ao decúbito ventral, não sendo observada alteração em nenhum filhote avaliado.

4.3.5 Dosagens hormonais

A saúde reprodutiva masculina é definida não só pelo desenvolvimento adequado do sistema reprodutor como pela manutenção de suas funções, portanto, o sistema genital masculino é totalmente dependente de andrógenos (LUCCIO-CAMELO; PRINS, 2011; SMITH; WALKER, 2014).

As células de Leydig são responsáveis pela produção do hormônio testosterona, que atua no desenvolvimento das características masculinas, essencial para a função continuada da espermatogênese, além de fornecer informações sobre a degradação do hormônio no fígado (OECD, 2009; ROSS; PAWLINA, 2012). O FSH controla as concentrações de testosterona, um fator imprescindível para o processo espermatogênico e o LH estimula a secreção de testosterona pelas células de Leydig (COUTO, 2011; SPRITZER; REIS, 2012). Portanto, os compostos que interferem na ação destes hormônios, têm impacto direto sobre a funcionalidades dos órgãos que compõem este sistema.

Neste estudo, foi observado aumento nos níveis de testosterona ($p < 0.001$) e nos níveis séricos de LH ($p < 0.001$) e FSH ($p < 0.001$), entre os animais dos grupos tratados G2 e G3 em relação ao G1 (**Tabela 9**). Estes resultados são dose dependente semelhantes aos encontrados por Sharma et al. (2011), ao investigar os efeitos da administração de extrato de jambu, por 28 dias.

Tabela 9- Efeito do EHAo, preparado a partir das flores de *A. oleracea*, sobre os níveis hormonais de testosterona, hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) dos animais avaliados.

Níveis hormonais	Grupos		
	G1- 0,5 mL de água destilada (n=5)	G2- 88,91 mg/kg de EHAo (n=5)	G3- 444,57 mg/kg de EHAo (n=5)
FSH (mIU/mL)	1.4±0.01 a,b	3.3±0.08 c	8.2±0.06
LH (mIU/mL)	4.3±0.07 a,b	7.6±0.08 c	10.6±0.12
Testosterona total (ng/mL)	1.7±0.03 a,b	4.7±0.03 c	8.7±0.02

Valores expressos em média ± D.P.M. Diferenças significativas ($p = 0,05$). Resultados analisados pela ANOVA com pós-teste de Tukey.

A importância da testosterona é mencionada em vários trabalhos, por desempenhar papel na manutenção do tecido erétil e na fisiologia peniana, modulação da função neural e na integridade do músculo liso (ANTONIO-CABRERA et al., 2011; KIM; WOOD, 2014). Schultz e colaboradores (2004) relatam que a deficiência de testosterona durante a puberdade diminuiu o número de montas, intromissões e ejaculações, o que os levou a concluir que a testosterona é essencial para aumentar o desejo sexual de machos maduros e para preparar o macho para responder à uma fêmea receptiva.

Erhabor e Idu (2017), estudaram a raiz da espécie *Aloe barbadensis*, que é bastante utilizada na Nigéria para aumentar a libido, e observaram que o aumento da testosterona é dose-dependente, dando suporte ao uso da raiz desta espécie como um afrodisíaco em machos.

A capacidade de diferentes plantas medicinais em melhorar a função sexual, é atribuída ao aumento da concentração de testosterona sérica, sendo que em algumas espécies a ação desse hormônio atuou especificamente nos reflexos penianos, como em animais tratados com *Arctium lappa* (JIANFENG et al., 2012) e *Tribulus terrestris* (SINGH et al., 2012).

Watcho e colaboradores (2017) observaram em seu estudo que *Ficus asperifolia* (*Moraceae*) possui atividade semelhante a andrógenos através da possível estimulação de células citoplasmáticas e/ ou receptores nucleares pelos compostos biativos encontrados em seus extratos. Neste estudo, o aumento da concentração sérica de testosterona é o possível mecanismo possivelmente, o responsável por seus efeitos afrodisíacos (MALVIYA et al., 2011; VYAS et al., 2016).

4.3.6 Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos vitais e reprodutores

Determinadas substâncias são capazes de atravessar a barreira testicular e alterar o peso deste órgão, indicando modificações no túbulo seminífero, interstício e na produção de espermatozoides, interferindo a espermatogênese, assim, o peso do testículo aparece como um parâmetro confiável na avaliação de lesão gonadal, por apresentar pouca variabilidade dentro de uma espécie (LENT et al., 2015; SAENPHET; JITJAINGAN; CHAIYAPO, 2015).

Durante as necropsias, não se observou alterações macroscópicas dos órgãos vitais e reprodutores dos ratos tratados com o EHAo, considerando os parâmetros: aspecto, cor, textura e forma. A análise do peso dos órgãos não indicou diferença significativa nos órgãos dos ratos machos (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Peso relativo de órgãos vitais e reprodutores de animais dos grupos controle (G1) e tratados (G2 e G3) com EHAo, preparado a partir das flores de *A. oleracea*, durante 30 dias.

Órgãos	G1- 0,5 mL de água destilada (n=5)	G2- 88,91 mg/kg de EHAo (n=5)	G3- 444,57 mg/kg de EHAo (n=5)
Baço	0.26±0.02	0.24±0.03	0.26±0.03
Coração	0.27±0.02	0.28±0.01	0.27±0.02
Fígado	2.85±0.35	2.81±0.26	2.73±0.25
Pulmões	0.39±0.01	0.37±0.05	0.38±0.02
Rins	0.65±0.05	0.63±0.04	0.62±0.05
Epidídimo	0.63±0.02	0.64±0.07	0.60±0.06
Testículos	0.92±0.07	0.94±0.07	0.95±0.08
Vesícula seminal	0.43±0.09	0.45±0.02	0.44±0.03

Valores expressos em média ± D.P.M. ANOVA uma via (Tukey) (p <0.05).

Autores como Russell e colaboradores (1990), propõem que exista uma correlação entre o número de células germinativas existentes nas gônadas e o peso testicular. Neste contexto, como não foi observado alteração no peso relativo dos testículos entre os grupos controle e tratados, é possível sugerir que o EHAo não alterou as estruturas dos túbulos seminíferos, nem a quantidade de células germinativas.

Outro fator importante é que a contagem de espermatozoides na secreção epididimária não demonstrou diferença significativa entre os grupos tratados com o EHAo (G2 e G3), comprando com o controle (G1) (**tabela 11**). Considerando tais dados, é possível concluir que a exposição de ratos machos ao EHAo no período avaliado não interfere no processo de espermatogênese. De forma semelhante, estudo conduzido por Santos et al., (2016) demonstrou que a administração do extrato de *Pradosia huberi* Ducke em ratos machos não altera a estrutura e função dos órgãos reprodutores e glândulas sensoriais desses animais.

4.3.7 Função espermática

4.3.7.1 Concentração, motilidade e morfologia espermática

A contagem de espermatozoides demonstrou que a concentração de espermatozoides ($10^6/\text{mL}$) foi de $369.0 \pm 24,2$ para o grupo G1 (controle), $359.3 \pm 34,4$ e $375.3 \pm 59,5$ para os grupos tratados G2 e G3, respectivamente, sem significância

estatística. Além disso, não houve alteração no peso dos órgãos, principalmente dos testículos, sugerindo não haver degeneração do epitélio epidimário nas doses utilizadas, mantendo-se também normal a concentração espermática (JEQUIER et al., 2010; BELLENTANI et al., 2011).

A motilidade espermática é uma das principais características associadas com a capacidade fertilizante do sêmen, sendo essencial para o transporte espermático através do trato genital feminino e para a fertilização (CARVALHO et al., 2010; LUCENA et al., 2014). O presente estudo não demonstrou diminuição da motilidade de espermatozoides de ratos tratados com o EHAo durante 30 dias (**Tabela 11**).

Perobelli et al. (2012) observaram que a aceleração do trânsito de espermatozoides pelo epidídimo compromete a maturação, ou seja, a motilidade dos espermatozoides e o potencial de fertilização, sendo observadas alterações protéicas na membrana plasmática dos espermatozoides coletados da cauda do epidídimo associadas à baixa qualidade do sêmen.

Tabela 11 - Concentração e motilidade espermática de animais dos grupos controle (G1) e tratado (G2 e G3) com EHAo, preparado a partir das flores de *A. oleracea*, durante 30 dias

Órgãos	G1- 0,5 mL de água destilada (n=5)	G2- 88,91 mg/kg de EHAo (n=5)	G3- 444,57 mg/kg de EHAo (n=5)
[] de esperm. (10^6 /mL)	369.0±24.2	359.3±34.4	375.3±59.5
Motilidade espermática	54.5±6.59	53.9±6.18	55.3±5.89

Valores expressos em média ± D.P.M. ANOVA uma via (Tukey) (p <0.05).

O aumento na porcentagem de alterações morfológicas presentes no ejaculado, correlaciona-se diretamente com a diminuição da fertilidade. Na análise da morfologia espermática foi nítido neste estudo que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com EHAo (G2 e G3) e o grupo controle (G1) ao comparar o percentual de espermatozoides íntegros e não íntegros (**Tabela 12**).

Tabela 12- Morfologia espermática de animais dos grupos controle (G1) e tratados (G2 e G3) com EHAo, preparado a partir das flores de *A. oleracea*, durante 30 dias

Parâmetros	G1- 0,5 mL de água destilada	G2- 88,91 mg/kg de EHAo (n=5)	G3- 444,57 mg/kg de EHAo (n=5)
Íntegros (%)	95.7±0.3	96±0.2	95.5±0.1
Não íntegros (%)	4.3±1.3	3.9±1.1	3.3±0.9

Valores expressos em média ± D.P.M. ANOVA uma via (Tukey) (p <0.05).

Referente aos não íntegros, houve um aumento do percentual de espermatozoides com a cauda curvada e sem cabeça em todos os grupos. A primeira

anormalidade pode ter ocorrido devido à alteração na osmolaridade das células durante a diluição, após a coleta, e o fato de alguns estarem sem cabeça, é possível que esta anormalidade seja consequência do procedimento de esfregaço realizado na preparação das lâminas. Contudo, para uma investigação mais aprofundada, outros testes podem ser realizados com a finalidade de obter mais informações como os testes de: penetração espermática, reação acrossômica, hemizona pelúcida, edema hipoosmótico e interação dos espermatozoides com o muco cervical (LAMB, 2010; SAMPLASKI et al., 2010).

A principal correlação encontrada foi que entre os três parâmetros analisados de maneira geral, uma boa estrutura espermática (morfologia) é necessária para obter boa motilidade. Como observado, os animais tratados com EHAo nas doses 88,91 mg/kg e 444,57 mg/kg não apresentaram efeitos tóxicos no sistema reprodutor, diferente daqueles relatados por Nusier et al. (2007), sobre o efeito potencialmente tóxico do extrato de *Rosmarinus officinalis* L. (α -pineno, 1,8 cineol e a cânfora como constituintes majoritários) no sistema reprodutivo de machos na dose de 500 mg/kg. Os autores constataram diminuição no peso médio do epidídimo, próstata, ducto deferente e vesícula seminal, além de declínio significativo na espermatogênese, no número de espermatócitos, espermátides e nos níveis de testosterona.

Neste trabalho, a produção de gametas, motilidade e a sua morfologia não foram afetadas pelo tratamento durante 30 dias com o EHAo v.o, considerando que as proporções de gametas normais e anormais foram comparativamente semelhantes entre os animais dos grupos controle e tratado.

Diante dos resultados obtidos:

- A análise química do extrato hidroetanólico das flores de *A. oleracea* revelou a presença do composto espilantol como componente majoritário, corroborando com resultados já descritos na literatura, em que a maior quantidade é encontrada nesta parte da planta.
- A administração do EHAo em fêmeas, nas condições experimentais deste estudo, é seguro, pois não foi observado sinais de toxicidade materna ou qualquer interferência gestacional ou reprodutiva. Por outro lado, o tratamento com EHAo foi capaz de aumentar o período de fertilidade, sem alterar a foliculogenese. Sugere-se a condução de estudos futuros relacionados à segurança do EHAo, incluindo o tratamento durante as demais fases do desenvolvimento.
- A administração do EHAo em machos, nas condições experimentais deste estudo demonstrou não interferir na espermatogênese, aumentou a libido e não alterou a fertilidade destes.

-
- AGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain Res Brain Protoc.**, v. 1, n. 2, p. 203-209, 1997.
- AGMO, A. On the concept of sexual arousal: a simpler alternative. **Horm Behav.**, v. 53, n. 2, p. 312-314, 2007.
- AGMO, A. Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). **J Comp Psychol.**, v. 117, n. 1, p. 3-14, 2003.
- AGMO, A.; SNOEREN, E. M. A cooperative function for multisensory stimuli in the induction of approach behavior of a potential mate, **PLoS One**, v.12, n.3, 2017.
- ALCANTARA, B. N.; KOBAYASHI, Y. T.; BARROSO, K. F.; SILVA, I. D. R.; ALMEIDA, M. B.; BARBOSA, W. L. R. Pharmacognostic analyses and evaluation of the in vitro antimicrobial activity of *Acmella oleracea* (L.) R. K Jansen (Jambu) floral extract and fractions. **J Med Plant Res.**, v.9, n.4, p.91-96, 2015.
- ALLOUH, M. Z. Effects of swimming activity on the copulatory behavior of sexually active male rats. **Int J Impot Res.**, v.27, n.3, p.113-117, 2015.
- ALLOUH, M. Z.; DARADKA, H. M.; ABU GHADA, J. H. Influence of *Cyperus esculentus* tubers (tiger nut) on male rat copulatory behavior. **BMC Complement Altern med.**, v.15, n.331, p.1-7, 2015.
- ALLOUH, M. Z.; DARADKA, H. M.; ALBARBARAWI, M. M.; MUSTAFA, A. G. Fresh onion juice enhanced copulatory behavior in male rats with and without paroxetine-induced sexual dysfunction. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.239, n.2, p.177-182, 2014.
- ALMEIDA, F. C.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **J Ethnopharmacol.**, v.73, n.1-2, p.53-60, 2000.
- AMANG, P. A.; TAN, P. V.; PATAMAKEN, S. A.; MEFE, M. N. Cytoprotective and antioxidant effects of the methanol extract of *Eremomastax speciosa* in rats. **Afr J Tradit Complement Altern Med.**, v. 11, n. 1, p. 165-171, 2014.
- ANDRADE, E.; MESQUITA, A. A.; CLARO, J. A.; ANDRADE, P. M.; ORTIZ, V.; PARANHOS, M.; SROUGI, M. Study of the efficacy of Korean red Ginseng in the treatment of erectile dysfunction. **Asian J Androl.**, v.9, n.2, p.241-244, 2007.
- ANDRADE, L. C.; ROTTA, I. W.; CHAVES, S. R.; UCHIDA, D. T.; FERREIRA, F. B. P.; JACOMASSI, E.; BOLET-CERANTO, D. C. F.; GAZIM, Z. C. Effectiveness of *Acmella oleracea* for topical anesthesia on buccal mucosa. **Rev Odonto Cienc**, v.28, n.3, p.61-65, 2013.
- ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A.; YAMANE, L. T.; CASTRO, K. N. C.; FERREIRA, A. R. F.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Toxic action of *Acmella oleracea*

extract on the male reproductiv system of *Amblyomma cajennense* ticks. **Vet Parasitol.**, v.244, p. 164-171, 2017.

ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; SPINDOLA, C. S.; RODRIGUES, R. A. F.; LABRUNA, M. B.; PIZANO, M. A.; CASTRO, K. N. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks Tick Borne Dis.**, v.8, n.1, p.65-72, 2016.

ANTONIO-CABRERA, E.; PAREDES, R. G. Effects of chronic estradiol or testosterone treatment upon sexual behavior in sexually sluggish male rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.101, n.3, p.336-341, 2012.

ARAÚJO, G. S.; MACHADO, A. F. P.; TACANI, P. M.; TACANI, R. E.; ALBERO, P. J. F.; LIEBANO, R. E. Massa corporal, imagem corporal e desejo por tratamentos estéticos nas diferentes fases do ciclo menstrual. **Saúde (Santa Maria)**, v. 41, n. 1, p. 77-84, 2015.

ARMOND, C. **Indicadores químicos, crescimento e bioeletrografias de plantas de jambu (*Acmella oleracea* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) e folha-da-fortuna (*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken) submetidas a tratamentos homeopáticos.**142f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) -Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

ARORA, S., VIJAY, S.; KUMAR D. Phytochemical and antimicrobial studies on the leaves of *Spilanthes acmella*. **J Chem Pharm Res.**, v.3, p.145-150, 2011.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Methods of the assessment of morphology and function of sperm: actual moment and future challenges. **Rev Bras Reprod Anim.**, v. 35, n.2, p. 145-151, 2011.

ARTARIA, C.; MARAMALDI, G.; BONFIGLI, A.; RIGANO, L.; APPENDINO, G. Lifting properties of the alkamide fraction from the fruit husks of *Zanthoxylum bungeanum*. **Int J Cosmet Sci.**, v.33, p.328-33, 2011.

AUWAD, W. A.; HAGI, S. K. Female sexual dysfunction: what Arab gynecologists think and know. **Int Urogynecol J.**, v.23, n.7, p.919-927, 2012.

BAE, S. S.; EHRMANN, B. M.; ETTEFAGH, K. A.; CECH, N. B. A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. **Phytochem anal.**, v. 21, n. 5, p. 438-43, 2010.

BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. **Hum Reprod Update.**, v.18, n.1, p.73-91, 2012.

BAILEY, S. A.; ZIDELL, R. H.; PERRY, R.W. Relationships Between Organ Weight and Body/ Brain Weight in the Rat: What Is this Best Analytical Endpoint? **Toxicol Pathol.**, v.32, n.4, p.448-466, 2004.

BARBIERI, D. S.; TONIAL, F.; LOPEZ, P. V.; SALES-MAIA, B. H.; SANTOS, G. D.; RIBAS, M. O.; GLIENKE, C.; VICENTE, V. A. Antiadherent activity of *Schinus*

terebinthifolius and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol.**, v.59, p.887-896, 2014.

BARBOSA, W. L. R.; TAVARES, I. C. C. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. 1 ed. Belém: UFPA, v.1, p.20, 2001.

BARHA, C. K.; GALEA, L. A. Influence of diferente estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus. **Biochim biophys Acta.**, v.1800, n.10, p. 1056-1067, 2010.

BASS, R. **Non-clinical safety sciences and their regulatory aspects procedures and guidelines**. Lisbon: Drug Information Association- DIA, 2011.

BELLENTANI, F. F.; FERNANDES, G. S.; PEROBELLI, J. E.; PACINI, E. S.; KIGUTI, L. R.; PUPO, A. S.; KEMPINAS, W. D. Acceleration of sperm transit time and reduction of sperm reserves in the epididymis of rats exposed to sibutramine. **J Androl.**, v.32, n.6, 2011.

BEREK, J. S.; **Berek & Novak's Gynecology**. 14th. Philadelphia: 14th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1671p, 2007.

BERGHEIM, D.; CHU, X.; AGMO, A. The function and meaning of female rat paracopulatory (proceptive) behaviors. **Behav Processes.**, v.118, p.34-41, 2015.

BOONEN, J.; BAERT, B.; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P.; SAEGER, S.; SPIEGELEER, B. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bioactive spilanthol. **J Pharm Biomed Anal.**, v.53, n.3, p.243-249, 2010.

BORGES, C. S.; MISSASSI, G.; PACINI, E. S.; KIGUTI, L. R.; SANABRIA, M.; SILVA, R. F.; BANZATO, T. P.; PEROBELLI, J. E.; PUPO, A. S.; KEMPINAS, W. G. Slimmer or fertile? Pharmacological mechanisms involved in reduced sperm quality and fertility in rats exposed to the anorexigen sibutramine. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-10, 2013.

BORGES, L. S.; VIANELLO, F.; MARQUES, M. O. M.; LIMA, G. P. P. Influence of organic and mineral soil fertilization and essential oil of *Spilanthes oleracea*. **Am J Plant Phys.**, v.7, p.135-142, 2012.

BOYE, A.; BOAMPONG, V. A.; TAKYI, N.; MARTEY, O. Assessment of an aqueous seed extract of *Parkia clappertoniana* on reproductive performance and toxicity in rodents. **J Ethnopharmacol.**, v.5, n.185, p.155-161, 2016.

BRANDOLT, T. D. D.; RODRIGUES, C. C.; FERRÃO, S. M. N.; SILVA, G. M. B. Efeito do extrato de *Plectranthus barbatus* (Andr.) Benth no desempenho reprodutivo de *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769). **Biotemas**, v.20, n.2, p.49-58, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, v. 2, 48p, 2013.

- BÜRGER, M. E.; AHLERT, N.; BALDISSEROTTO, B.; LANGELOH, A.; SCHIRMER, B.; FOLETTO, R. Analysis of the abortive and/or infertilizing activity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart. Coville). **Braz J Vet Res Anim. Sci.**, v.36, n.6, 1999.
- CABRAL, P. R. F.; PASA, M. C. Mangava-brava: *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae) e a etnobotânica em Cuibá, MT. **Revista Biodiversidade**, v.8, n.1, p.2-21, 2009.
- CAMPBELL, M. A.; GOLUB, M. S.; IYER, P.; KAUFMAN, F. L.; LI, L. H.; MORAN MESSER, F.; MORGAN, J. E.; DONALD, J. M. Reduced water intake: implications for rodents developmental and reproductive toxicity studies. **Birth Defects Research.**, v.86, n.3, p.157-175, 2009.
- CÁRDENAS, S. E. Recuperación de produtos nativos de los Andes: kiwicha y maca. **Rev Antropol Facultad Cien Soc E A P Antropol** (ISSN: 1811-380X), v.3, n.3, p. 193-201, 2005.
- CARVALHO, G.R.; RATES, D.M.; LOURENÇO, G.G.; PUGUESI, G.; KER, P.G.; OLIVEIRA, R.R.; SANTOS, M.C.R. III **Curso de inseminação e criopreservação de sêmen de eqüídeos**. Viçosa. 2010
- CASTRO, A.P.; MELLO, F.B.; MELLO, J.R.B. Avaliação toxicológica do *Ginkgo biloba* sobre a fertilidade e reprodução de ratos Wistar. **Acta Scien Vet.**, v.33, n.3, p.265-9, 2005.
- CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JUNIOR, L. M. Acaricide activity *in vitro* of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitol Res.**, v. 113, p. 3697-3701, 2014.
- CAVALCANTI, R.; SERRANO, R.; LOPES, G. **Ejaculação precocel/ rápida: A consenso da academia internacional de sexologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- CHAKRABORTY, A. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. **Indian J Pharmacol.**, v.42, n.5, p.277-279, 2010.
- CHAKRABORTY, A.; DEVI, R. K. B.; RITA, S.; SHARATCHANDRA, K.; SINGH, T. I. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. **Indian J Pharmacol.**, v.36, n.3, p.148-150, 2004.
- CHANG, C. V.; FELÍCIO, A. C.; REIS, J. E. P.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) in rats. **J Ethnopharmacol.**, v.81, n.2, p. 265-269, 2002.
- CHEN, H.; LI, M. W. M.; YAN, C. C. Drebrin and spermatogenesis. **Adv Exp Med Biol.**, v. 1006, p. 291-312, 2017.
- CHENG, Y. B.; LIU, R. H.; HO, M. C.; WU, T. Y.; CHEN, C. Y.; LO, I. W.; HOU, M. F.; YUAN, S. S.; WU, Y. C.; CHANG, F. R. Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules.**, v.20, n.4, p. 6970-6977, 2015.

- CHINDO, B. A.; AMOS, S.; ODUTOLA, A. A.; VONGTAU, H. O.; ABBAH, J.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. S. Central nervous system activity of the methanol extract of *F. platyphylla* stem bark. **J Ethnopharmacol.**, v.85, p.131-137, 2003.
- CHOI, B. R.; KIM, H. K.; PARK, J. K. Penile erection induced by scoparone from *Artemisia capillaris* through the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway. **World J Mens Health.**, v.35, n.3, p. 196-204, 2017.
- CHRISTIAN, M. S. Test Methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. **Method of Toxicology.** W. H. Taylor & Francis, Editor. Philadelphia: 1301-1381, 2001.
- CHU, X.; AGMO, A. Sociosexual behaviours in cycling, intact female rats (*Rattus norvegicus*) housed in a seminatural environment. **Behaviour**, v.151, n.8, p.1143-1184, 2014.
- CILIA-LOPEZ, V. G.; JUAREZ-FLORES, B. I.; AGUIRRE-RIVERA, J. R.; REYES-AGUERO, J. A. Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. **Pharm Biol.**, v.48, n.2, p.195-200, 2010.
- COCCHIO, S.; BERTONCELLO, C.; BALDOVIN, T.; BUJA, A.; MAJORI, S.; BALDO, V. Self-reported genital warts among sexually-active university students: a cross-sectional study. **BMC Infect Dis.**, v.18, n.1, p. 41, 2018.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. v. 6, 1984.
- CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J. *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species. **Reprod Domest Anim.**, v.36, n.1, p.3-9, 2001.
- COSTA, J. F. L. V. **Abordagem Psicoterapêutica no Tratamento da Disfunção Erétil.** 27f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina). Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2010.
- COUTO, J. A. **Avaliação da atividade esteroidogênica testicular de derivados tiazolidinônicos potencialmente hipoglicemiantes.** Recife – PE. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – CCB da Universidade Federal de Pernambuco. 2011.
- CUNHA-LAURA, A. L.; AUHAREK, S. A.; OLIVEIRA, R. J.; SIQUEIRA, J. M.; VIEIRA, M. C.; LEITE, V. S.; PORTUGAL, L. C. Effects of *Maytenus ilicifolia* on reproduction and embryo-fetal development in Wistar rats. **Genet. Mol. Res.**, v.13, n.2, p.3711-3720, 2014.
- CUZIN, B. **Anatomy and Physiology of Female Sexual Organs.** In: Prost, H., Reisman, Y. (eds.), The ESSM Syllabus of Sexual Medicine, European Society for Sexual Medicine, Medix Publishers, 2012
- D'CRUZ, S. C.; VAITHINATHAN, S.; JUBENDRADASS, R.; MATHUR, P. P. Effects of plants and plant products on the testis. **Asian J Androl.**, v.12, p.468-479, 2010.
- DAMASCENO, D. C.; KEMPINAS, W. G.; VOLPATO, G. T.; CONSONNI, M.; RUDGE, M. V. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. **Anomalias congênitas – Estudos experimentais** (1st edn). Belo Horizonte: Editora Médica, 2008.

DAS, B.; CHOUDHURY, M. D.; TALUKDAR, A. D.; CHOUDHURY, S.; NATH, D.; CHETIA, P. Traditionally used Ethnomedicinal formulations for birth control by ethnic people of Tripura. **Int Congr Ethnopharmacol.**, p.17-19, 2012.

DAS, B.; DEY, A.; DAS, T. A.; NONGALLEIMA, K. H.; CHOUDHURY, M. D.; DEB, L. Antifertility efficacy of *Drynaria quercifolia* (L.) J. Smith on female Wistar albino rats. **J Ethnopharmacol.**, v.153, n.2, p.424-429, 2014.

DEVOTO, L.; KOHEN, P.; MUNÓZ, A.; STRAUSS, J. F. Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. **Reprod Biomed Online.**, v.18, n.2, p.19-24, 2009.

DIMITRIADIS, E.; MENKHORT, E. New generation contraceptives: interleukin 11 family cytokines as non-steroidal contraceptive targets. **J Reprod Immunol.**, v.88, n.2, p.233-239, 2010.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocr Rev.**, v.30, n.6, p.624-712, 2009.

EL-SHARAKY, A.S.; NEWAIRY, A. A.; ELGUINDY, N. M.; ELWAFI, A. A. Spermatotoxicity, biochemical changes and histological alteration induced by gossypol in testicular and hepatic tissues of male rats. **Food Chem Toxicol.**, v.48, p.3354-3361, 2010.

EMA. European Medicines Agency. **Guideline on the Need for Non-Clinical Testing in Juvenile Animals of Pharmaceuticals for Pediatric Indications**, London, UK, 2008.

ERHABOR, J. O.; IDU, M. Aphrodisiac potentials of the ethanol extract of *Aloe barbadensis* Mill. root in male Wistar rats. **BMC Complement Altern Med.**, v.17, n.1, p.360-370, 2017.

ESTRADA, C. M.; GHISAYS, V.; NGUYEN, E. T.; CALDWELL, J. L.; STREICHER, J.; SOLOMON, M. B. Estrogen signaling in the medial amygdala decreases emotional stress responses and obesity in ovariectomized rats. **Horm Behav.**, v. 98, p.33-44, 2017.

ESTRADA-REYES, R.; CARRO-JUÁREZ, M.; MARTÍNEZ-MOTA, L. Pro-sexual effects of *Turnera diffusa* Wild (*Turneraceae*) in male rats involves the nitric oxide pathway. **J Ethnopharmacol.**, v.146, n.1, p.164-172, 2013.

ETTEBONG, E. O.; NWAFOR, P. A.; EKPO, M.; AJIBESIN, K. K. Contraceptive, estrogenic and anti-estrogenic potentials of methanolic root extract of *Carpolobia lutea* in rodents. **Pak J Pharm Sci**, v.24, n.4, p.445-449, 2011.

FANELLI, C.; DELLÉ, H.; CAVAGLIERI, R. C.; DOMINGUEZ, W. V.; NORONHA, I. L. Gender differences in the progression of experimental chronic kidney disease induced by chronic nitric oxide inhibition. **Biomed Res Int.**, 2017.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (*Asteraceae*) -Jambu. **Rev Fitos.**, v.5, p.83-90, 2010.

FERNANDES ES.; PINTO RM.; DE PAULA REIS JE.; DE OLIVEIRA GUERRA M.; PETERS VM. Effects of *Ginkgo biloba* extract on the embryo-fetal development in Wistar rats. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v.89, n.2, p.133-138, 2010.

- FERNANDEZ, C. D. B.; PORTO, E. M. ARENA, A. C.; KEMPINAS, W. G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. **Inter J Androl.**, v.31, n.4, p.427-437, 2008
- FORTES, L. H. S. **Efeito da ovariectomia sobre o balanço autonômico cardíaco de ratas submetidas à desnutrição proteica [manuscrito]**. 119 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Ouro Preto. 2010.
- FREITAS, T. G.; AUGUSTO, P. M.; MONTANARI, T. Effects of *Ruta graveolens* L. on pregnant mice. **Contraception**, v.71, n.1, p.74-77, 2005.
- FREITAS, V. S. **Desenvolvimento e avaliação da eficiência de um bioadesivo contendo extrato de *Spilanthes acmella* L. Murray para administração oral como anestésico tópico**. Piracicaba, SP [s.n.], 105p, 2014.
- GADELHA, I. C. N.; RANGELZ, A. H. N.; SILVA, A. R.; BLANCO, B. S. Efeitos do gossipol na reprodução animal. **Acta Vet Brasil.**, v.5, n.2, p.129-135, 2011.
- GERARDIN, D. C. C.; BERNARDI, M. M.; MOREIRA, E. G.; ODUVALDO, C. M.; PEREIRA, O. C. M. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.83, p. 618-623, 2006.
- GERBINO, A.; SCHENA, G.; MILANO, S.; MILELLA, L.; BARBOSA, A. F.; ARMENTANO, F.; PROCINO, G.; SVELTO, M.; CARMOSINO, M. Spilanthol from *Acmella Oleracea* Lowers the Intracellular Levels of cAMP Impairing NKCC2 Phosphorylation and Water Channel AQP2 Membrane Expression in Mouse Kidney. **PLoS One.**, v.11, n.5, 2016.
- GIKNIS, M.; CLIFFORD, C. **Clinical laboratory parameters for Crl: WI (Han) Rats**. Charles River Laboratories, 2008.
- GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.**, v.80, n.2, p.84-97, 2007.
- GOLUB, M. S.; COLLMAN, G. W.; FOSTER, P. M.; KIMMEL, C. A.; RAIPERT-DE, M. E.; REITER, E. O.; SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E.; TOPPARI, J. Public Health Implications of Altered Puberty Timing. **Pediatrics**, v. 121, p. 218-230, 2008.
- GOMES, A. C. M. M.; NICOLE, M.; MATTOS, J. K.; PEREIRA, S. I. V.; PEREIRA, P.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R.; CARPIDEVILLE, G.; MOITA, A. W.; CARNEIRO, R. M. D.G. Concentration of β -Ecdysone (20E) in susceptible and resistant accessions of *Pfaffia glomerata* infected with *Meloidogyne incognita* and histological characterisation of resistance. **Nematol Leiden**, v. 12, n.5, p. 701-709.
- GOONASEKERA, M. M.; GUNAWARDANA, V. K.; JAYASENA, S. G.; BALUSABRAMANIAN, S. Pregnancy terminating effect of *Jathropa curcas* in rats. **J Ethnopharmacol.**, v.47, n.3, p.117-123, 1995.
- GORE, A. C. GnRH: **The master molecule of reproduction**. 2º ed. New York. Springer Verlag, p. 217-221, 2013.

- GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Screening for reproductive toxicity in rats for a decoction of *Himathanthus sucuuba* stem bark. **J Ethnopharmacol.**, v.34, n.2-3, p. 95-99, 1991.
- GUERRA, M. O.; SOUZA, E. R.; PETERS, V. M. Capacidade preliminar do efeito interceptivo do lapachol em ratas. **Rev Assoc Med Bras.**, v.48, p.135-139, 2002.
- GUTIERREZ-PAJARES, J. L.; ZUNIGA, L.; PINO, J. *Ruta graveolens* aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development. **Reprod Toxicol.**, v.17, n.6, p.667-672, 2003.
- GUYTON; HALL. **Fundamentos de Fisiologia**. 12^a ed. Rio de Janeiro. Elsevier, p. 613-621, 2012.
- HAMMOUD, A.; MEIKLE, A. W.; REIS, L. O.; GIBSON, M.; PERESON, C. M. CARRELL, D. T. Obesity and Male Infertility: A Practical Approach. **Semin Reprod Med.**, v.30, n.6, p. 486-495, 2012.
- HANSEN, J. T. **Netter-Anatomia Clínica**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.36-37, 2015.
- HEIJKOOP, R.; HUIJGENS, P. T.; SNOEREN, E. M. S. Assessment of sexua behavior in rats: The potentials and pitfalls. **Behav Brain Res.**, 2017
- HELLSTROM, W. J.; OVERSTREET, J. W.; SIKKA, S. C.; DENNE, J.; AHUJA, S.; HOOVER, A. M.; SIDES, G. D.; CORDELL, W. H.; HARRISON, L. M.; WHITAKER, J. S. Semen and sperm reference ranges for men 45 years of age and older. **J Androl.**, v.27, n.3, p.421-428, 2006.
- HENNEKAM, R. C. M.; ALLANSON, J. E.; BIESECKER, L. G.; CAREY, J. C.; OPITZ, J. M.; VILAIN, E. Elements of morphology: Standard terminology for the external genitalia". **Am J Med Genet Part A**, v.161, p.1238-1263, 2013.
- HERDY, G. V.; CARVALHO, A. P. Ação do espilantol (extraído do jambu) sobre a atividade elétrica do coração do coelho. Eletrocardiograma experimental. **Arq Bras Cardiol.**, v.43, n.5, p.315-320, 1984.
- HIND, N.; BIGGS, N. **Curtis's Bot. Mag.** v.20, n.1, p.31-39, 2003.
- HISERODT, R. D.; POPE, B. M.; COSSETTE, M.; DEWIS, M. L. Proposed mechanisms for the fragmentation of doubly allylic alkenamides (tingle compounds) by low energy collisional activation in a triple quadrupole mass spectrometer, **J Am Soc Mass Spectrom.**, v.15, n.10, p.1462-1470, 2004.
- HOLLENBACH, J. A.; MEENAGH, A.; SLEATOR, C.; ALAEZ, C.; BENGOCHE, M.; CANOSSI, A.; CONTRERAS, G.; CREARY, L.; EVSEEVA, I.; GORODEZKY, C.; HARDIE, R. A.; KARLSEN, T. H.; LIE, B.; LUO, M.; MARTINETTI, M.; NAVARETTE, C.; OLIVEIRA, D. C.; OZZELLA, G.; PASI, A.; PAVLOVA, E.; PINTO, S.; PORTO, L. C.; SANTOS, P.; SLAVCEV, A.; SRINAK, D.; TAVOULARIS, S.; TONKS, S.; TRACHTENBERG, E.; VEJBAESYA, S.; MIDDLETON, D. Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15th International Histocompatibility Workshop: worldwide variation in the KIR loci and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA. **Tissue Antigens.**, v.76, n.1, p.9-17, 2010.

HOSSAIN, H.; Shahid-Ud-Daula, A. F. M.; Jahan, I. A.; Nimmi, I.; Hasan, K.; Haq, M. M. Evaluation of antinociceptive and antioxidant potential from the leaves of *Spilanthes paniculata* growing in Bangladesh. **Int J Pharm Phytopharm Res.**, v.1, n.4, p.178-186, 2012.

HULL, E. M.; WOOD, R. I.; McKENNA, K. E. Neurobiology of Male Sexual Behavior. In: NEILL, J. D. et al.. (Eds.), **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Elsevier, 2006, p.1729-1824.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Detection of toxicity to reproduction for medicinal products e toxicity to male fertility s5(R2)**, 2005.

ISLAM, M.W.; TARIQ, M.; AGEEL, A. M.; AL-SAID, M. S.; AL-YHYA, A. M. Effects of *Salvia haematodes* on sexual behaviour of male rats. **J Ethanopharmacol.**, v.33, n. 1-2, p. 67-72, 1991.

JACOBSON, M. The structure of espilantol. **Chem Ind.**, v.12, p.50-51, 1957.

JAHROMI, B. N.; MOSALLANEZHAD, Z.; MATLOOB, N.; DAVARI, M.; GHOBADIFAR, M. A. The potential role of granulosa cells in the maturation rate of immature human oocytes and ambryo development: A co-culture study. **Clin Exp Reprod Med.**, v.42, n.3, p.111-117, 2015.

JEQUIER, A. M. Semen analysis: a new manual and its application to the understanding of semen and its pathology. **Asian J Androl**, China, v. 12, p. 11-13, 2010.

JIANFENG, C.; PENGYING, Z.; CHENGWEI, X.; TAOTAO, H.; YUNGUI, B.; KAOSHAN, C. Effect of aqueous extract of *Arctium lappa* L. (burdock) roots on the sexual behavior of male rats. **Compl Alter Med**, v.12, p.1-8, 2012.

JUAREZ-ROJAS, L.; VIGUERAS-VILLASENÖR, R. M.; CASILLAS, F.; RETANA-MÁRQUEZ, S. Gradual decrease in spermatogenesis caused by chronic stress. **Acta Histochem.**, v. 119, n.3, p. 284-291, 2017.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Masculino. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 415-431, 2011.

KAPLAN, H. S. **Disorders of sexual desires and other new concepts and techniques in sex therapy**. New York: Brunner/Maazel; 1979.

KARLSON, P.; LUSCHER, M. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. **Nature**, v.183, n.4653, p.55-56, 1959.

KICMAN, A. T. Biochemical and physiological aspects of endogenous androgens. **Handb Exp Pharmacol.**, n.195, p.25-64, 2010.

KIM, J. Y.; WOOD, R. I. Anabolic-androgenic steroids and appetitive sexual behavior in male rats. **Horm Behav.**, v.66, n.4, p.585-590, 2014.

KOCKOTT G. Psychotherapy for sexual dysfunctions and desire disorders. **Bundes Gesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.**, v.50, n.1, p.11-18, 2007.

KOHTZ, A. S.; WALF, A. A.; FRYE, C. A. Effects of non-contingent cocaine on 3 alpha-androstanediol. II. Disruption of lordoses of proestrous rats. **Physiol Behav.**, v. 2017.

KONG, Y. C.; LAU, C. P.; WAT, K. H.; NG, K. H.; BUT, P. P.; CHENG, K. F.; WATERMAN, P. G. Antifertility principle of *Ruta graveolens*. **Planta Med.**, v.55, n.2, p.176-178, 1989.

KUMAR, D.; MISHRA, P. K. Plant based contraceptive popular among tribals of Jharkhand. **Biosci Discovery.**, v.2, p.11-14, 2011.

KUNTZE, L.B.; KONDO, A.K.; BEZERRA, B.T.S.; PINTO, T.; CAMARGO, I.C.C. Estudo comparativo dos efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* L. e *Panax ginseng* C. A. Meyer na reprodução de ratos machos e fêmeas Wistar. **Rev Bras Plantas Med.**, Botucatu, v.14, n.1, p.34-42, 2012

KUSEMIJU, T. O.; OSINUBI, A. A.; NORONHA, C. C.; OKANLAWON, A. O. Effect of aqueous extract of the bark of *Carica papaya* on testicular histology in Sprague-Dawley rats. **Nig Q J Hosp Med.**, v.20, n.3, p.133-137, 2010.

KUSHIMA, H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, M. A.; VIANA, E.; COELHO-FERREIRA, M.; BRITO, A. R. M. S. Gastroactive activity of *Pradosia huberi* on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **J. Ethnopharmacol.**, v.101, p.61-67, 2005

LA TORRE, A.; GIUPPONI, G.; DUFFY, D.; CONCA, A. Sexual Dysfunction Related to Psychotropic Drugs: A Critical Review – Part I: Antidepressants. **Pharmacopsychiatry**, v. 46, n. 5, p. 191-199, 2013.

LAMB, D. J. Semen analysis in 21st century medicine: the need for sperm function testing. **Asian J Androl.**, v. 12, p. 64-70, 2010.

LEIBLUM, S. R.; WIEGEL, M. Psychotherapeutic interventions for treating female sexual dysfunction. **World J Urol.**, v. 20, n.2, p.127-136, 2002.

LEITE, S. P.; MEDEIROS, P. L.; SILVA, E. C.; MAIA, M. B. S.; LIMA, V. L. M.; SAUL, D. E. Embryotoxicity in vitro with an extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. **Reprod Toxicol.**, v.18, n.5, p.701-705, 2004.

LENT, E. M.; CROUSE, L. C.; WALLACE, S. M.; CARROL, E. E. Peri-pubertal administration of 3-nitro-1, 2, 4-triazol-5-one (NTO) affects reproductive organ development in male but not female Sprague Dawley rats. **Reproductive Toxicology.**, v.57, p. 1-9, 2015.

LIENOU, L. L.; TELEFO, P. B.; NJIMOU, J. R.; NANQUE, C.; BAYALA, B. R.; GOKA, S. C.; BIAPA, P.; YEMELE, M. D.; DONFACK, N. J.; MBEMYA, J. T.; TAGNE, S. R.; RODRIGUES, A. P. Effect of the aqueous extract of *Senecio bialfræ* (Oliv. & Hiern) J. Moore on some fertility parameters in immature female rat. **J Ethnopharmacol.**, v.161, p.156-162, 2015.

- LIMA, C. S.; DE MEDEIROS, B. J.; FAVACHO, H. A.; DOS SANTOS, K. C.; DE OLIVEIRA, B. R.; TAGLIALEGNA, J. C.; DA COSTA, E.V.; DE CAMPOS, K. J.; CARVALHO, J.C. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). **Phytomedicine**, v.12, p.1013-1023, 2011.
- LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influence of steroid hormones on folliculogenesis. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, n.4, p.472-482, 2011.
- LINDER, R.E.; STRADER, L. F.; SLOTT, V. L.; SUAREZ, J. D. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposure to fourteen reproductive toxicants. **Reprod Toxicol.**, v.6, n.6, p.491-505,1992.
- LIU, C.; PENG, J.; MATZUK, M. M.; YAO, H.H.C. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicelular interactions via oocyte and granulosa cells. **Nat Commun.**, v.6, n.6934, p.1-19, 2015.
- LOHIYA, N. K.; MANIVANNAN, B.; GARG, S. Toxicological investigations on the methanol subfraction of the seeds of *Carica papaya* as a male contraceptive in albino rats. **Reprod Toxicol.**, v.22, n.3, p.461-468, 2006.
- LOHMILLER, J. J.; SWING, S. P. **Reproduction and breeding**. IN:; SUCKOW, M. A.; WEISBROTH, S. H.; FRANKLIN, C. L. The Laboratory Rat. 2 ed. Elsevier Academic press: San Diego., p.148-155, 2006.
- LORENZI, H. E. Plantas daninhas do Brasil: terrestre, aquáticas, Parasitas, tóxicas e medicinais. Nova Odessa, 1982.
- LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. *Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 512p, 2002.
- LUCCIO-CAMELO, D. C.; PRINS, G. S. Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v.127, n.1-2, p.74-82, 2011.
- LUCENA, C.A.O.; MAIA, M.S.; MAIA, J.J.A.; SILVA, G.F.; SOUSA, T.M.L.; MOURA, C.E.B. Influência da época do ano sobre os parâmetros seminais de garanhões pôneis. **Acta Vet Brasil.**, v.8. supl.2. 2014.
- MADHUBABU, G.; YENUGU, S. Allethrin toxicity causes reproductive dysfunction in mela rats. **Environ Toxicol.**, v. 36, n.6, p.1701-1710, 2017
- MAGANHA, J.; ROCHA, E. S.; BRANDÃO, M. A. F.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Embryo development alteration in rats treated with lapachol. **Braz arch biol technol.**, v. 49, n.6, p. 927-934, 2006.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol.**, v.62, v. 4A, p.609-614, 2002.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**, Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 220p, 1995.

- MARQUES, R. M.; OSHIO, L. T. Técnica da coleta e contagem de espermatozoides em roedores. Informe técnico. **Rev Int Est Exp.**, v. 1, n. 1, p. 34, 2009.
- MATSUI, A. S.; ROGERS, J.; WOO, Y. K.; CUTTING, W. C. Effects of some natural products on fertility in mice. **Med Pharmacol Exp Int J Exp Med.**, v. 16, n.5, p. 414-424, 1967.
- MALVIYA, N.; JAIN, S.; GUPTA, V.B.; VYAS, S. Recent studies on aphrodisiac herbs for the management of male sexual dysfunction - a review. **Drug Research**, v.68, p. 3-8, 2011.
- MELNYK, J. P.; MARCONE, M. F. Aphrodisiacs from plant and animal sources-A review of current scientific literature. **Food Res Int.**, v.44, p.840-850, 2011.
- MENDES, C. C.; MARINHO, C. M, MOREIRA-JUNIOR, V. F, QUEIROZ, F. M.; DANTAS, G. L, MACEDO, M. F, OLIVEIRA, C. N.; SCHWARZ, A. Evaluation of *Bauhinia monandra* aqueous and ethanol extracts in pregnant rats. **Pharm Biol.**, v.48, n.7, p.780-785, 2010.
- MENDES, F. R. Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. **Braz J Pharm.**, v.21, n.4, p.754-763, 2011.
- MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocr Rev.**, v.32, n.1, p.81-151, 2011.
- MOENE, O.; SNOEREN, E. M. Mate choice could be random in female rats (*Rattus norvegicus*). **Physiol Behav.**, 184, p. 1-5, 2018.
- MOHAMMED, A.; ENGIDAWORK, E. Reproductive parameters are differentially altered following subchronic administration of *Catha edulis* F. (Khat) extract and cathinone in male rats. **J Ethnopharmacol.**, v.134, n.3, p.977-983, 2011.
- MOLINA, P. E. **Fisiologia Endocrina**. 4ª ed. Porto Alegre: AMGH, p. 213-248, 2014.
- MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, v.65, n.2, p.171-175, 2002.
- MONTANARI, T.; DE CARVALHO, J. E.; DOLDER, H. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss on spermatogenesis. **Contraception**, v.57, n.5, p.335-339, 1998.
- MORAES-SOUZA, R. Q.; SOARES, T, S.; CARMO, N. O.; DAMASCENO, D. C.; CAMPOS, K. E.; VOLPATO, G. T. Adverse effects of *Croton urucurana* B. exposure during rat pregnancy. **J Ethnopharmacol.**, v.6, n.199, p.328-333, 2017.
- MOREIRA, V. M.; MAIA, J. G.; DE SOUZA, J. M.; BORTOLOTO, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Characterization of convulsions induced by a hexanic extract of *Spilanthes acmella* var. oleracea in rats. **Braz J Med Biol Res.**, v.22, n.1, p. 65-67, 1989.
- MORENO, S. C.; CARVALHO, G. A.; PICANÇO, M. C.; MORAIS, E. G.; PEREIRA, R. M. Bioactivity of compounds from *Acmella oleracea* against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and selectivity to two non-target species. **Pest Manag Sci.**, v.68, n.3, p.386-393, 2012.

MOURÃO, C. A. J.; ABRAMOV, D. M. **Fisiologia essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 352-360, 2011.

MUKHERJEE, S. K.; MITRA, S. Some abortifacient plants used by the tribal people of West Bengal. **Nat Prod Rad.**, v.8, n.2, p.167-171, 2009.

MUMMENHOFF, K.; POLSTER, A.; MUHLHAUSEN, A.; THEIBER, G. *Lepidium* as a model system for studying the evolution of fruit development in *Brassicaceae*. Review paper. **J Exp Bot.**, v.60, n.5, p.1503-1513, 2009.

MUNJACK, D. J.; KANNO, P. H. Retarded ejaculation: a review. **Arch Sex Behav.**, v.8, n.2, p.139-150, 1979.

MURPHY, L. L.; LEE, T. J. Ginseng, sex behavior, and nitric oxide. **Ann N Y Acad Sci.**, v.962, p.372-377, 2002.

NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v.56, n.5, p.759-762, 1992.

NARAYANA, K. R.; REDDY, M. S.; CHALUVADI, M. R.; KRISHNA, D. R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian J Pharmacol.**, v.33, n.1, p.2-16, 2001.

NASCIMENTO, A. M.; DE SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F.; MARIA-FERREIRA, D.; DA SILVA, L. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v.85, p.137-142, 2013.

NAYANATARA, A. K.; AKSHATHA, A.; SHARANNYA, K.; ANWAR, A. S.; REJEESH, E. P.; BHAGYALAKSHMI, K.; SNEHAB, S.; REKHA, D. K.; SHEILA, R. P. Effect of *Cynodon dactylon* extract on estrous cycle and reproductive organs in female wistar rats. **Int J Anal Biomed Pharm Sci.**, v.1, n.3, p.10-15, 2012

NCHEGANG, B.; MEZUI, C.; LONGO, F.; NKWENGOUA, Z. E.; AMANG, P.; TAN, P. V.; Effects of the aqueous extract of *Eremomastax speciosa* (*Acanthaceae*) on sexual behavior in normal male rats. **Biomed Res Int.**, v.2016, p. 1-10, 2016.

NDENECHO, E. N. Herbalism and resources for the development of ethnopharmacology in Mount Cameroon region. **Afr J Pharm Pharmacol.**, v.3, n.3, p.78-86, 2009.

NOCERINO, E.; AMATO, M.; IZZO, A.A. The aphrodisiac and adaptogenic properties of ginseng. **Fitoterapia**, v.71, n.1, p.S1-S5, 2000.

NOMURA, E. C. O.; RODRIGUES, M. R. A.; SILVA, C. F.; HAMM, L. A.; NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. **J Ethnopharmacol.**, v.150, p. 582-589, 2013.

NUNES, F. D. C. R.; RAUJO, D. A. F.V.; BEZERRA, M. B.; SOTO-BLANCO, B. Effects of gossypol present in cottonseed cake on the spermatogenesis of goats. **J Anim Vet Adv.**, v.9, n.1, p. 75-78, 2010.

NUSIER, M.K.; BATAINEH, H.N.; DARADKAH, H.M. Adverse effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on reproductive function in adult male rat. **Exp Biol Med.**, v. 232, p. 809-213, 2007.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline for testing of chemicals. **Acute Oral Toxicity- Fixed Dose Procedure.** (Nº 420), 14p, 2001.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline for testing of chemicals. **Hershberger Bioassay in Rats: a short-term screening assay for (anti) androgenic properties**, 2009.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Deveopment. Guideline for testing of chemicals. **Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test.** (nº 421),14p, 2015.

OLIVEIRA, J. M. G.; PEREIRA, L. J. C.; MOURA, E. R.; SOUSA, M. R. S. C.; SALES, P. A. B.; SILVA, S. M. M. S.; LIRA, S. R. S.; COSTA, A. P. R. Subacute toxicity of *Myracrodruon urundeuva* leave ethanolic extract and its effects on the estrous cycle of female Wistar rats. **Rev Bras PI Med.**, v.18, n.2, p.539-546, 2016.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F.; CELEGHINI, E. C.; REEB, P. D.; MARTINS, J. P.; SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F.; MONTEIRO, F. M.; HOSSEPIAN, L. V. F. Assessment of *in vitro*sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Anim Reprod Sci.**, v.137, n.3-4, p.145-155, 2013.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K.V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v.32, n.1, p.56-67, 2000.

OSHIO, L. T.; GUERRA, M. O. Métodos em toxicologia do sistema reprodutor masculino e fertilidade em roedores. **Rev Int Est Exp.**, v.1, n.1, p.34, 2009.

PEREIRA, O. S. **Espermograma: Manual de Bancada e Atlas.** Medicina e Saúde, Varginha, MG, 1. ed, p. 19-37, 2017.

PEROBELLI, J. E.; ALVES, T. R.; TOLEDO, F. C.; FERNADEZ, C. D.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KLINEFELTER, G. R.; KEMPINAS, W. G. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reprod Toxicol.**, v.33, n.3, p.308-315, 2012.

PIMENTEL, M. M. L.; SANTOS, F. A. dos; DIAS, R. V. D.; MACÊDO, L. B. de; FONSECA, Z. A. A. de S.; ANDRÉ, W. P. P.; RIBEIRO, W. L. C. **Monitoramento do ciclo estral de fêmeas equinas por meio de citologia vaginal, ultrassonografia e dosagem hormonal.** Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, Umuarama, v.17, n. 1, p. 69-75, 2014.

PINHEIRO, M. T.; BASTOS, D. D. C.; RODRIGUES, A. B. L.; RAMOS, R. S.; ALMEIDA, S. S. M. S. Antioxidant and cytotoxic potential of aqueous crude extract of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen. **J Chem Pharm Res.**, v.7, n.12, p. 562-569, 2015.

PIRES JR, H. B.; BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; CUNHA, L. C.; LINO JR, R. S.; MELO, D. F. A.; PEREIRA, M. E. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. **Ciênc Anim Bras.**, v.13, n.4, p.512-519, 2012.

PLEWKA, J. **Estudo sobre variações no método de citologia em meio líquido para o exame de papanicolaou.** 110p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2007.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v.14, p.850-867, 2009.

PRACHAYASITTIKUL, V.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: a review. **EXCLI J.**, n.12, p. 291-312, 2013.

RAJENDRAN, A.; RAJAN, S. *Drynaria quercifolia* – an antifertility agent. **Ancient Sci Life**, v.15, p.286-287, 1996.

RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J. Bioactive N-isobutylamides from flower buds of *Spilantes acmella*. **Phytochemistry**, v.26, n.51, p.729-732, 1999.

RANI, S. A.; MURTY, S. U. Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. **Afr J Biomed Res.**, v.9, p.67-69, 2006

RATNASOORIYA, W. D.; PIERIS, K. P. P. Attenuation of Persistent Pain and Hyperalgesia by *Spilanthus acmella* Flowers in Rats. **Pharm Biol.**, v.43, n.7, p. 614-619, 2005.

RATNASOORIYA, W. D.; PIERIS, K. P. P.; SAMARATUNGA, U.; JAYAKODY, J. R. A. C. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **J Ethnopharmacol.**, v.91, n.2-3, p.317-320, 2004.

REATEGUI, C. C.; ÁVILA, J. D.; TAMOYO, J. S.; VILLACAMPA, S. C.; GASTELÙ, J. V.; GUEORGUIEVA, M. P.; HUASUPOMA, M. V.; LIPA, K. B. La ingesta de *Lepidium peruvianum* y el desarrollo de las células de la línea espermatogénica e intersticial de Leyding en testículo de ratas jóvenes holtzman. **Rev Odontol Sanmarq**, v.12, n.1, p.10-12, 2009.

REGADAS, R. P. **Efeito do creme de jambú (*Acmella oleracea*) sobre a função sexual masculina e feminina.** Dissertação (Mestrado). 70f. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

REVATHI, P.; VANI, B.; SARATHCHANDIRAN, I.; KADALMANI, B.; PRAKASH SHYAM, K.; PALNIVEL, K. Reproductive toxicity of *Capparis aphylla* (Roth.) in male albino rats. **Int J Pharm Biomed Res**, v.1, n.3, p.102-112, 2010.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: Oportunidades Econômicas sustentáveis.** Manaus: INPA, 405p, 2001.

REYES-GARCÍA V: The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. **J Ethnobiol Ethnomed**, v6, n.32, 2010.

RIECKE, K.; STAHLMANN, R. Test systems to identify reproductive toxicants. **Andrologia**, v. 32, p. 209-218, 2000.

RIOS, M.Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; GUTIERREZ, M.D. Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). **J Ethnopharm.**, v. 110, p.364-367, 2007.

ROBB, G.W.; AMMAN, R.P; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **J Reprod Fertil.**, v.54, n.1, p.103-107, 1978.

RODRIGUES-ALVES, P. S. B. **Interferência da moxidectina na motivação sexual e ereção peniana de ratos: envolvimento de neurotransmissores hipotalâmicos e estriatais**. 89f. Tese (Doutorado). Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, 2007.

RODRIGUEZ VILLAMIL, P., WEI, H., MOREIRA, G., CACCIA, M., FERNANDEZ TARANCO, M., BÓ, G.A. Fertilization rates and in vitro embryo production using sexed or non-sexed semen selected with a silane-coated silica colloid or Percoll. **Theriogenology**, v.78, p.165-171, 2012

ROMÃO, N. F.; SILVA, F. C.; VIANA, R. N.; FERRAZ, A. B. F. Análise fitoquímica e potencial antioxidante do extrato das flores de *Spilanthes acmella*. **South Am J Bas Educ Tech Technol.**, v.2, n.2, p.23-32, 2015.

ROMBAUT, C.; MERTES, H.; HEINDRYCKX, B.; GOOSSENS, E. Human *in-vitro* spermatogenesis from pluripotent stem cells: in need of a stepwise differentiation protocol? **Mol Hum Reprod.**, 2017.

ROOS, M.H.; PAWLINA W. **Histologia- texto atlas**, 6ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro p.798-820, 2012.

RUSSELL L. D.; ETTLIN, R. A.; HIKIM, A. P. S.; CLEGG, E. D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. 1. ed. Clearwater: Cache River Press, 1990.

SÁ, B. M. **Estudo da toxicidade não clínica do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec**. 145 f. Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, 2014.

SÁ, B. M.; LIMA, C. S.; SILVA, U. D. A.; CARVALHO, H. O.; FERNANDES, C. P.; RESQUE, R. L.; OLIVEIRA, T. T.; CARVALHO, J. C. T. Subchronic toxicity evaluation of the hydroethanolic extract from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec in Wistar rats. **Afr J Pharm Pharmacol.**, v.9, n.8, p.223-229, 2015.

- SACHETTI, C. G.; DE CARVALHO, R. R.; PAUMGARTTEN, F. J.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. **Food Chem Toxicol.**, v.49, n.5, p.1080-1085, 2011.
- SAENPHET, K.; JITJAINGAN, A.; CHAIYAPO, M. Reproductive toxicity test of plant derived insecticide in male rats. **Chiang Mai J Sci.**, v. 42, n.2, p. 816-821, 2015.
- SAKUMA, Y. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. **J Neuroendocrinol**, v.21, p. 410-414, 2009.
- SALLES, M. G. F.; ARAUJO, A. A. Cyclic and gestational corpus luteum: review. **Rev. Bras Reprod Anim.**, v.34, n.3, p.185-194, 2010
- SAMPLASKI, M. K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.; SABANEKH, E. New generation of diagnostic tests for infertility: Review of specialized semen tests. **Int J Urol**, Japan, v. 17, p. 839-847, 2010.
- SANTOS, C. S.; ANTUNES PS.; DOS SANTOS, F. L.; ROCHA, A. O.; PITA, J. C.; XAVIER, A. L.; MACÊDO, C. L.; JACOB, K. C.; DE OLIVEIRA, N. A.; DE MEDEIROS, A. A.; DINIZ, M. F.; DE CÁSSIA, S. R. Assessment of *Pradosia huberi* effects on the reproductive system of male rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.241, n.5, p.519-526, 2016.
- SANTOS, T. R. **Desenvolvimento neonatal de crias de ratas Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) tratadas com o flavonoide ipriflavona durante a lactação plena.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2011.
- SCHULTZ, K. M.; RICHARDSON, H. N.; ZEHR, J. L.; OSETEK, A. J.; MENARD, T. A.; SISK, C. L. Gonadal hormones masculinize and defeminize reproductive behaviors during puberty in the male Syrian hamster. **Horm Behav.**, v.45, n.4, p.242-249, 2004.
- SELGRADE, J. F.; HARRIS, L. A.; PASTEUR, R.D. A model for hormonal control of the menstrual cycle: Structural consistency but sensitivity with regard to data. **J Theor Biol.**, v.260, n.1, p.572-580, 2009.
- SEWANI-RUSIKE, C. R. Antifertility effects of *Pouzolzia mixta* in female Wistar rats. **Afr J Tradit Complement Altern Med.**, v.10, n.3, 526-532, 2013.
- SFALSINI, R. B. T. **Análise comparada dos requisitos regulamentares e científicos não-clínicos para o registro de novas moléculas no âmbito do Brasil e da ICH.** 280f. Dissertação (mestrado)- Universidade de Lisboa Faculdade de Farmácia, 2013.
- SHAIK, A.; KANHERE, R. S.; CUDDAPAH, R.; NELSON, K. S.; VARA, P. R.; SIBYALA S. Antifertility activity of *Artemisia vulgaris* leaves on female Wistar rats. **Chin J Nat Med.**, v.12, n.3. p.180-185, 2014.
- SHAIKH, M. V.; KALA, M.; RAVAT, N.; NIVSARKAR, M. Abortifacient potential of methanolic extract of *Anthocephalus cadamba* stem bark in mice. **J Ethnopharmacol.**, v.173, p.313-317, 2015.

SHARMA, V.; BOONEN, J.; CHAUHAN, N. S.; THAKUR, M.; DE SPIEGELEER, B.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytomedicine**, v.18, n.13, p.1161-1169, 2011.

SHAMLOUL, R. Natural aphrodisiacs. **J Sex Med.**, v.7, p.39-49, 2010.

SILVA, C. A. P. **Avaliação da citotoxicidade do extrato de *Spilanthes oleracea* e seu potencial uso no tratamento do câncer.** 70f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). Curso de Ciências Biológicas- Faculdade de Educação e e Artes da Universidade do Vale da Paraíba, 2012.

SILVA, A. C. C.; PRATA, A. P. N.; MELLO, A. A. Flowering plants of the Grota do Angico Natural Monument, Caatinga of Sergipe, Brazil. **Check List**, v.9, n.4, p.733-739, 2013.

SILVA, M. J.; SALES, M. F. O gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae - Euphorbiaceae Juss.) no bioma Caatinga do estado de Pernambuco – Brasil. **Rodriguésia**, v.55, n.84, p.101-126, 2004.

SINGH, S.; NAIR, V.; GUPTA, Y. K. Evaluation of the aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in sexually sluggish male albino rats. **J Phar Pharm**, v.3, p. 43-47, 2012.

SMITH, L. B.; WALKER, W. H. The regulation of spermatogenesis by androgens. **Semin Cell Dev Biol.**, v.30, p. 2-13, 2014

SNOEREN, E. M. The role of adrenoceptors in the central nervous system in male and female rat sexual behavior. **Eur J Pharmacol**, v.753, p.229-245, 2015.

SNOEREN, E. M.; CHAN, J. S.; DE JONG, T. R.; WALDINGER, M. D.; OLIVIER, B.; OOSTING, R. S. A new female rat animal model for hypoactive sexual desire disorder; behavioral and pharmacological evidence. **J Sex Med.**, v.8, p.44-56, 2011.

SNOEREN, E. M.; VEENING, J. G.; OLIVIER, B.; OOSTING, R. S. Serotonin 1A receptors and sexual behavior in female rats: a review. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.121, p.43-52, 2014.

SOARES, C. P.; LEMOS, V. R.; SILVA, A. G.; CAMPOY, R. M.; SILVA, C. A. P.; MEGEGON, R. F.; ROJAHN, I.; JOAQUIM, W. M. Effect of *Spilanthes acmella* hydroethanolic extract activity on tumour cell actin cytoskeleton. **Cell Biol Int.**, v.38, p. 131-135, 2014.

SOUSA SOARES, T.; DAMASCENO, D. C.; KEMPINAS, W. G.; RESENDE, F. M.; CORREA DOS SANTOS, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VOLPATO, G. T. Effect of *Himatanthus sucuuba* in Maternal Reproductive Outcome and Fetal Anomaly Frequency in Rats. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.**, v.104, n.5, p.190-195, 2015.

SPIEGELEER, B.; BOONEN, J.; MALYSHEVA, S. V.; MAVUNGU, J. D.; SAEGER, S.; ROCHE, N.; BLONDEEL, P. TAEVERNIER, L.; VERYSER, L. Skin penetration enhancing properties of the plant n-alkylamide spilanthol. **J Ethnopharmacol.**, v.148, p.117-125, 2013.

SPRITZER, P. M.; REIS, F.M. **Sistema Reprodutor Masculino.** Fisiologia. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1116, 2012.

- SURESH, P.S.; RAJAN, T.; TSUTSUMI, R. New targets for old hormones: inhibins clinical role revisited. **Endocr J.**, v.58, n.4, p.223-235, 2011.
- TAPIA, F. L. **Citología del tracto genital femenino y de la glándula mamaria**. Málaga: Vértice. 315p, 2008.
- THAKUR, M.; CHAUHAN, N. S.; BHARGAVA, S.; DIXIT, V. K. A Comparative Study on aphrodisiac activity of some ayurvedic herbs in male albino rats. **Arch Sex Behav.**, v38, n. 6, p.1009-1015, 2009.
- TOLEDO, M. R. S.; SILVA, C. C. A.; ANTONELLO, D.; PIMENTA, K. R.; VIEIRA, M. C.; RAMOS, M. B. M.; HEREDIA, N. A.; SCALON, S. P. Q.; BAZZANO, T. S. C. Extratos aquosos de *Pfaffia glomerata* spreng e seu efeito tóxico em ratas prenhez. **Rev Hort Bras.**, v.22, n.2, p.493, 2004.
- TORRES, J. M. E.; CHÁVEZ, A. G. Alcamidas em plantas: distribución e importancia. **Av Perspect.**, v.20, p377-387, 2001.
- TYLER, V. **The new honest herbal**. Philadelphia: Stickley, 254p, 1987.
- UGWAH-OGUEJIOFOR, C. J.; BELLO, S. O.; OKOLO, R. U.; ETUK, E. U.; UGWAH, M. O.; IGBOKWE, V. U. *Ficus platyphylla* promotes fertility in female *Rattus norvegicus* Wistar strain: a preliminary study. **Reprod Biol Endocrinol.**, v.2, n. 9, p.145, 2011.
- VANDENBERGH, J. G. **Pheromones and mammalian reproduction**. 3ª ed., p. 2041-2058, 2006.
- VANPUTTE, C.; REGAN, J.; RUSSO, A. **Anatomia e Fisiologia de Seeley**. Porto Alegre: AMGH. 10ª ed, p.1017-1032, 2016.
- VÁSQUEZ, G. R.; GUERRERO, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichiasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue Cell.**, v.39, n.3, p.151-160, 2007.
- VICKERY, B. H.; LUNENFELD, B. **GnRH Analogues in Reproduction and Gynecology**. Netherlands: Springer Verlag., 256p, 2013.
- VITRAL, G. S. F.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Mecanismos da ação embriotóxica do barbatimão (*Stryphnodendron pollyphyllum* M.). **Reprodução**, v.3, p.222-226, 1987.
- VOLPATO, G. T.; FRANCA-FARJE, L. A.; DAMASCENO, D. C.; OLIVEIRA, R. V.; HIRUMA-LIMA, C. A.; KEMPINAS, W. G. Effect of essential oil from *Citrus aurantium* in maternal reproductive outcome and fetal anomaly frequency in rats. **An Acad Bras Cienc.**, v.87, n.1, p.407-415, 2015.
- VYAS, N. Y.; RAVAL, M. A. Aphrodisiac and spermatogenic potential of alkaloidal fraction of *Hygrophila spinosa* T. Ander in rats. **J Ethnopharmacol.**, v.194, p.947-953, 2016.
- WALTERS, K. A.; ALLAN, C. M.; HANDELSMAN, D. J. Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome. **Biol Reprod.**, v.86, p.149-149, 2012.

WATCHO, P.; MELI WATIO, H.; WANKEU-NYA, M.; NGADJUI, E.; DEEH DEFO, P.; NKENG-EFOUET, P. A.; NGUELEFACK, T. B.; KAMANYI, A. Androgenic effects of aqueous and methanolic extracts of *Ficus asperifolia* in male Wistar rats. **BMC Complement Altern Med.**, v.17, n.1, p.42, 2017.

WATTS, A. G.; BOYLE, C. N. The functional architecture of dehydration-anorexia. **Physiol Behav.**, v.100, n.5, p.472-477, 2010.

WHO. World Health Organization. **laboratory manual for the examination and processing of human semen.** 5th ed. Geneva: WHO: 260p, 2010.

WOLFSEGGGER, M. J.; JAKI, T.; DIETRICH, B.; KUNZLER, J. A.; BARKER, K. A none statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. **Toxicol Appl Pharmacol.**, n.240, p.117-122, 2009.

WONGSAWATKUL, O.; PRACHAYASITTIKUL, S.; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; SATAYAVIVAD, J.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Vasorelaxant and antioxidante activities of *Spilanthes Acmella* Murr. **Int J Mol Sci.**, v.9, n.12, 2724-2744, 2008.

WU, L. C.; FAN, N. C.; LIN, M. H.; CHU, I. R.; HUANG, S. J.; HU, C. Y.; HAN, S. Y. Anti-inflammatory effect spilanthol from *Spilanthes Acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-Induced Inflammatory mediators. **J Agric Food Chem.**, v. 56, p. 2341-2349, 2008.

YADAV, R.; YADAV, N.; KHARYA, M. D.; SAVADI, R. Preliminary studies on diuretic effect of *Spilanthes acmella* leaves extracts in rats. **Int J Phar Pharma Scien.**, v.3, p. 245-247, 2011.

YAKUBU, M. T.; BUKOYE, B. B. Abortifacient potentials of the aqueous extract of *Bambusa vulgaris* leaves in pregnant Dutch rabbits. **Contraception.**, v.80, n.3, p. 308-313, 2009.

ZHENG, W.; NAGARAJU, G.; LIU, Z.; LIU, K. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3ks) signaling in the mammalian ovar. **Mol Cell Endocrinol.**, v.356, n.1-2, p. 24-30, 2012.

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

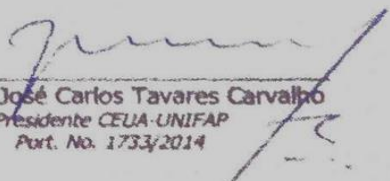
CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na reunião de 02 de fevereiro de 2017, o parecer referente ao protocolo no. **0020/2016** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado **"ESTUDO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen SOBRE A FUNÇÃO ESPERMÁTICA E REPRODUTIVA DE RATOS WISTAR ADULTOS"** coordenado por **Clarice Flexa da Rocha**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 02 February 2017, the final decision about the Protocol **0020/2016** and certify that the research project entitled **" ESTUDO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen SOBRE A FUNÇÃO ESPERMÁTICA E REPRODUTIVA DE RATOS WISTAR ADULTOS"** coordinated by **Clarice Flexa da Rocha**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 02 de fevereiro de 2017


Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNIFAP
Rod. Juvenalino Juscelino Kubitschek, km 02 – Campus Meno Zero,
Macapá - AP, 68903-419 email: farmacos@unifap.br
Fone (68)4009.2907



Action of the hydroethanolic extract of the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen on the reproductive performance of Wistar females rats: A popular female aphrodisiac from the Amazon

Clarice Flexa da Rocha^{a,b,d}, Yuri de Medeiros Souza Lima^c, Helison Oliveira Carvalho^{a,c}, Rodrigo Costa Pinto^{a,d}, Irlon Maciel Ferreira^{a,b}, Andres Navarrete Castro^e, Clarissa Silva Lima^{a,b,d}, José Carlos Tavares Carvalho^{a,b,f,*}

^a Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Rod. Juscelino Kubitschek, km 02, S/N, Macapá, AP 68903-419, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Rod. Juscelino Kubitschek, KM 02, S/N, Macapá, AP 68903-419, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Rod. Juscelino Kubitschek, KM 02, S/N, Macapá, AP 68903-419, Brazil

^d Laboratório de Toxicologia Reprodutiva, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Rod. Juscelino Kubitschek, KM 02, S/N, Macapá, AP 68903-419, Brazil

^e Laboratorio de Farmacología de Productos Naturales, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

^f Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amapá, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Acmella oleracea
Reproductive performance
Spilanthal
Estrous cycle
Aphrodisiac

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The species *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Asteraceae), popularly known as jambú, is marketed in fairs as a female aphrodisiac and has several pharmacological activities already confirmed, among them the sexual stimulant action. The objective of this study was to evaluate the effects of the oral administration of the hydroethanolic extract of *A. oleracea* flowers (EHAo) on wistar rats during the pre-mating, mating, and pre-implantation period.

Material and methods: During the treatment period, measurements of feed intake, water intake, weight, estrous cycle, behavior, reproductive parameters, biochemical parameters, hematological parameters, and histopathology of ovaries were performed daily.

Results: In the gas chromatography analysis - mass spectrometry characterization, the compound (2E, 6Z, 8E)-N-isobutyldeca-2,6,8-trienamide (spilanthal) was detected as the majority compound at the 84% concentration. In the conditions of this study, EHAo did not cause maternal toxicity. However, in the estrous cycle, the frequency of the Proestrous (P) and Estrous (E) phase was significantly increased with the doses of 88.91 and 444.57 mg/kg of the EHAo in relation to the control. On the other hand, the metaestrous (M) and diestrous (D) phases showed a significant reduction in their frequency in the groups treated with EHAo. Water intake increased significantly ($p < 0.01$), as well as the triglyceride levels, the total cholesterol and fractions ($p < 0.05$), and the percentage of neutrophils ($p < 0.05$).

Conclusion: It is concluded, therefore, that the treatment with EHAo, which is one of the forms popularly used, is safe in the concentrations and time of treatment studied as it is able to influence the estrous cycle without altering folliculogenesis and fertility.

1. Introduction

The *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen species is popularly known as jambu, agrião-do-Pará, agrião-do-norte, agrião-bravo, agrião-do-Brasil,

and botão-de-ouro, native of South America, very cultivated, and used as a seasoning in the cuisine of the northern region of Brazil. At the Ver-o-Peso fair in the city of Belém, Pará, Brazil, the largest city from the Amazon region, it is marketed as a female aphrodisiac and is sought by

* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Rod. Juscelino Kubitschek, km 02, S/N, Macapá, AP 68903-419, Brazil.
E-mail address: farmacos@unifap.br (J.C.T. Carvalho).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.024>

Received 30 August 2017; Received in revised form 15 December 2017; Accepted 15 December 2017

Available online 20 December 2017

0378-8741/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.