

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

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA E REPRODUTIVA DA**  
**OLEUROPEÍNA (SEGMENTO I) EM RATOS WISTAR**

**RAQUEL LUÍSA BREUNIG**

**PORTO ALEGRE**

**2021**

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

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA E REPRODUTIVA DA  
OLEUROPEÍNA (SEGMENTO I) EM RATOS WISTAR**

**Autora: Raquel Luísa Breunig**

**Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Veterinárias na área de  
Farmacologia e Toxicologia.**

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

PORTO ALEGRE

2021

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

**CIP - Catalogação na Publicação**

Breunig, Raquel Luísa  
Avaliação da Toxicidade Crônica e Reprodutiva da  
Oleuropeína (Segmento I) em Ratos Wistar / Raquel  
Luísa Breunig. -- 2021.  
69 f.  
Orientador: João Roberto Braga de Mello.

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

1. Olea europaea L.. 2. Oleuropeína. 3.  
Fertilidade. 4. Toxicologia. I. Mello, João Roberto  
Braga de, orient. II. Título.

Raquel Luísa Breunig

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA E REPRODUTIVA DA  
OLEUROPEÍNA (SEGMENTO I) EM RATOS WISTAR

Aprovada em 29 MAR 2021

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof<sup>ª</sup> Dra<sup>a</sup> Fernanda Bastos de Mello

Membro da comissão

---

Prof<sup>ª</sup> Dra<sup>a</sup> Marlete Brum Cleff

Membro da comissão

---

Prof. Dr. Mario Carlos Araújo Meireles

Membro da comissão

## **AGRADECIMENTOS**

À equipe maravilhosa que me ajudou durante esses dois anos:

Ao professor Mello, muito obrigada pela oportunidade, confiança e por toda ajuda, serei eternamente grata.

À professora Fernanda Mello, pela paciência, ajuda, ensinamentos e pelo exemplo.

Às colegas de mestrado, Muriel Rodrigues e Gisele Seberino, obrigada por toda ajuda e parceria, serei sempre grata.

Às queridas estagiárias, Carolina, Thailana, Ester, Giselle e Mylena, muito obrigada pela disposição, alegria e todo esforço que desprenderam para ajudar no projeto.

À minha família:

Ao meu companheiro Nill, muito obrigada de todo coração pelo apoio, amor, suporte, paciência, compreensão e auxílio nesses anos;

Aos meus pais Clarsi e Ernane, meus irmãos Solange e Jairo e aos meus sobrinhos Rafael e Alice, obrigada por serem minha base e meu suporte a vida toda e para sempre.

À minha segunda família de Porto Alegre e de Santa Catarina, que tornam meus dias mais alegres e leves, em especial à Gabriela, Sílvio, Matheus, Miriam, Gustavo, Inês e Hipólito obrigada por tudo e mais um pouco.

Às minhas amigas Pâmela, Michele e Maria, obrigada pelos momentos de distração e amizade nesse período e sempre.

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

## EPÍGRAFE

*“Quanto maior o conhecimento menor o ego, quanto  
maior o ego, menor o conhecimento”*

Albert Einstein

## RESUMO

A *Olea europaea* L. (oliveira) é uma árvore frutífera, originária do mediterrâneo e disseminada por diversos países, incluindo o Brasil, onde seu cultivo encontra-se em ascensão. É considerada um dos cultivares mais antigos do planeta, sendo reconhecida por sua ampla gama de atividades biológicas, as quais são atribuídas aos seus compostos fenólicos. A oleuropeína é o composto fenólico majoritário da *Olea europaea* L., presente em grandes concentrações na planta. Com o objetivo de determinar a segurança no uso dessa substância, o presente estudo avaliou o potencial de toxicidade crônica e reprodutiva da oleuropeína, sobre a fertilidade e o desenvolvimento ponderal de ratos Wistar machos e fêmeas, sendo o segmento I de um estudo mais amplo, composto por 3 segmentos. Constituíram-se quatro grupos experimentais compostos por 30 fêmeas e 10 machos cada: CN (controle negativo – água destilada), G1(oleuropeína 500 mg/kg/dia), G2 (oleuropeína 1000 mg/kg/dia) e G3 (oleuropeína 2000 mg/kg/dia). Os machos foram tratados antes (70 dias) e durante o acasalamento (21 dias), e as fêmeas antes (14 dias) e durante o acasalamento (máximo de 21 dias), gestação (21 dias) e lactação (21 dias). Para identificar alterações toxicológicas nos animais, foram avaliados: consumo relativo de água e ração, evolução do peso corporal, peso relativo dos órgãos e histopatologia, taxas reprodutivas e sinais de toxicidade. Nos machos foi avaliado ainda, dosagem de testosterona, número e morfologia espermática. Os resultados não demonstraram prejuízos nos parâmetros reprodutivos avaliados em nenhum grupo tratado, contrariamente nos machos, foram observados aumentos significativos na produção diária de espermatozoides em G2 ( $275,59 \pm 27,20$ ) e G3 ( $261,94 \pm 47,84$ ). O G2 também apresentou as maiores dosagens de testosterona ( $6,47 \pm 1,42$ ) e menor número de espermatozoides anormais ( $5,61 \pm 0,69$ ). Nas fêmeas, o G2 apresentou elevação nas taxas de gestação (95,85%) e natalidade (100%). Os machos dos três grupos tratados com oleuropeína apresentaram aumento do peso relativo do fígado (G1 =  $3,92 \pm 0,11$ ; G2 =  $3,89 \pm 0,09$ ; G3 =  $4,29 \pm 0,16$ ), quando comparados ao grupo controle ( $3,31 \pm 0,10$ ), todavia não foram observadas alterações histopatológicas hepáticas ou em qualquer outro órgão avaliado. Foram observadas oscilações nos consumos de água e alimento dos três grupos experimentais durante esse estudo, mais evidenciado nos animais do G3 no início do período pré-acasalamento, onde machos e fêmeas tiveram menores consumos de alimento e menores ganhos de peso, diminuições que não se mantiveram ao longo do tempo bem como não ocorreram outras alterações sistêmicas, sugerindo uma adaptação por parte dos animais. Ninhadas mais leves ao nascer foram observadas em G2 ( $6,90 \pm 0,05$ ) e G3 ( $6,52 \pm 0,07$ ), além disso, as fêmeas de G3 tiveram menor ganho de peso durante os últimos dias do período gestacional, sinais que podem sugerir toxicidade materna. Esses resultados fazem da oleuropeína uma substância promissora devido a sua ação benéfica sobre parâmetros de fertilidade masculina, todavia sugere-se cautela no seu uso durante o período gestacional, especialmente em altas doses.

Palavras chave: *Olea europaea* L., Oleuropeína, Fertilidade, Toxicologia

## ABSTRACT

*Olea europaea L.* (olive tree) is a fruit tree of Mediterranean origin and disseminated in several countries, including Brazil, where its cultivation is growing. It is considered one of the oldest cultivars on the planet, being recognized for its wide range of biological activities, which are attributed to its phenolic compounds. Oleuropein is the major phenolic compound of *Olea europaea L.*, present in high concentrations in the plant. In order to determine its safety use, the present study evaluated the chronic and reproductive potential toxicity of oleuropein, over fertility and body development of male and female Wistar rats. It was segment I of a larger study, which comprised 3 segments. Four experimental groups were formed: CN (negative control - distilled water), G1 (oleuropein 500 mg / kg / day), G2 (oleuropein 1000 mg / kg / day) and G3 (oleuropein 2000 mg / kg / day). Males were treated before (70 days) and during mating (21 days), and females before (14 days) and during mating (21 days maximum), gestation (21 days) and lactation (21 days). To identify male and female reproductive system changes, we evaluated relative water and feed consumption, body weight evolution, relative organs weight and histopathology, reproductive rates and toxicity signs. In males, we also evaluated testosterone dosage, sperm number and morphology. Results showed no impairment on evaluated reproductive parameters in any treated group, contrary in males were observed a significant increase in daily sperm production in G2 ( $275,59 \pm 27,20$ ) and G3 ( $261,94 \pm 47,84$ ). G2 also presented higher testosterone levels ( $6,47 \pm 1,42$ ) and lower number of abnormal sperm ( $5,61 \pm 0,69$ ). In females, G2 showed an increase in pregnancy (95,85%) and birth (100%) rates. Males of the three oleuropein treated groups showed relative liver weight increase (G1 =  $3,92 \pm 0,11$ ; G2 =  $3,89 \pm 0,09$ ; G3 =  $4,29 \pm 0,16$ ), when compared to the control group ( $3,31 \pm 0,10$ ), however, no histopathological changes in liver or any other evaluated organs were observed. Fluctuations in water and food consumption of the three experimental groups were observed during this study, which was more evident at the beginning of pre-mating period in G3 animals, were males and females had lower food consumptions and lower weight gains, decreases that were not maintained over time and there were no other systemic changes, suggesting an adaptation of these animals. Litters birth weights were lower in G2 ( $6,90 \pm 0,05$ ) and G3 ( $6,52 \pm 0,07$ ), moreover, G3 females also had less weight gain during the latest gestational days, signs that may suggest maternal toxicity. These results make oleuropein a promising substance due its beneficial action on male fertility parameters, however caution is suggested in its use during pregnancy, especially in high doses.

**Keywords:** *Olea europaea L.*, Oleuropein, Fertility, Toxicology

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – *Olea europaea* L.: (a) árvore; (b) folhas; (c) flores; (d) frutos; (e) casca..... 19
- Figura 2 – Estrutura química da oleuropeína e hidroxitirosol e tirosol.....22
- Figura 3 – Evolução da massa corporal (%) de fêmeas tratadas com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período pré-acasalamento. Dados expressos em média. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.... 37
- Figura 4 – Evolução da massa corporal (%) de fêmeas tratadas com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de gestação. Dados expressos em média. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni..... 38
- Figura 5 – Evolução da massa corporal (%) de fêmeas tratadas com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante a lactação. Dados expressos em média. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni. .... 38
- Figura 6 – Evolução da massa corporal (g) de machos tratados com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período pré-acasalamento. Dados expressos em média. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni..... 39
- Figura 7 – Evolução da massa corporal (g) de machos tratados com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de acasalamento. Dados expressos em média. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas. .... 39
- Figura 8 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de fêmeas tratadas com água destilada (CN), e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período pré-acasalamento. Dados expressos em média. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni..... 40
- Figura 9 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de fêmeas tratadas com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de gestação. Dados expressos em média. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas. .... 41
- Figura 10 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de fêmeas tratadas com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de lactação. Dados expressos em média (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni. .... 41

Figura 11 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de machos tratados com água destilada (CN), e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de acasalamento. Dados expressos em média. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni. ....42

Figura 12 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de machos tratados com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de acasalamento. Dados expressos em média. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni. ....42

Figura 13 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de água de fêmeas tratadas com Água destilada (CN), e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de pré-acasalamento. Dados expressos em média. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.....43

Figura 14 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de água de fêmeas tratadas com Água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de gestação (A) e lactação B. Dados expressos em média. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas. ....44

Figura 15 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de água de machos tratados com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período pré-acasalamento. Dados expressos em média. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.....45

Figura 16 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de água de machos tratados com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período pré-acasalamento. Dados expressos em média. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.....45

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Usos tradicionais e contemporâneos da *Olea europaea* ..... 21
- Tabela 2 – Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas adultas tratadas por via oral com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), nos períodos pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Dados expressos em média ± EPM (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ..... 46
- Tabela 3 – Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos adultos tratados por via oral com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), nos períodos de pré-acasalamento e acasalamento. Dados expressos em média ± EPM. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ..... 46
- Tabela 4 – Taxas reprodutivas das fêmeas adultas tratadas por via oral com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), nos períodos pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Dados expressos em média ± EPM. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ..... 47
- Tabela 5 – Parâmetros reprodutivos dos machos tratados por via oral com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), nos períodos de pré-acasalamento e acasalamento. Dados expressos em média ± EPM. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ..... 48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CN	Grupo Controle Negativo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Proteção Ambiental)
FDA	Food and Drug Administration (Departamento de Alimentos e Remédios)
g	Gramas
G1	Grupo 1 (500 mg/kg/dia de oleuropeína)
G2	Grupo 2 (1000 mg/kg/dia de oleuropeína)
G3	Grupo 3 (2000 mg/kg/dia de oleuropeína)
HIDROX	Hydrolyzed Aqueous Olive Pulp Extract (Extrato Aquoso de Polpa de Oliva)
HMPC	Committee on Herbal Medicinal Products (Comitê de produtos medicinais a base de plantas)
Kg	Kilogramas
LTDA	Limitada
MG	Estado de Minas Gerais
mg	Miligramas
ml	Mililitros
NaCl	Cloreto de Sódio
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development (Organização para Cooperação Economica e Desenvolvimento)
RS	Estado do Rio Grande do Sul
SEAPA	Secretaria de Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio à Micro e pequenas Empresas
TECSA	Tecnologia em Sanidade Animal
UFRGS	Universidade federal do Rio Grande do Sul
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	18
<b>2.2</b>	<b>Objetivo específico</b> .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
<b>3.1</b>	<b>Caracterização botânica</b> .....	19
<b>3.2</b>	<b><i>Olea europaea</i> L. (oliveira)</b> .....	20
<b>3.3</b>	<b>Oleuropeína</b> .....	21
3.3.1	Atividades da oleuropeína.....	22
3.3.2	Toxicidade da oleuropeína .....	24
3.3.3	Avaliação toxicológica.....	26
3.3.4	Testes de toxicidade reprodutiva.....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
<b>4.1</b>	<b>Insumos</b> .....	28
<b>4.2</b>	<b>Protocolo Experimental Toxicidade Crônica e Reprodutiva (Segmento I)</b> .....	28
4.2.1	Animais .....	28
4.2.2	Delineamento experimental .....	29
4.2.3	Tratamento .....	30
4.2.4	Acasalamento .....	30
4.2.5	Lactação .....	30
4.2.6	Eutanásia e avaliação dos machos.....	31
4.2.6.1	Dosagem de testosterona.....	33
4.2.7	Eutanásia e avaliação das fêmeas.....	33
4.2.7.1	Taxas reprodutivas .....	33
4.2.8	Variáveis avaliadas.....	35
<b>4.3</b>	<b>Análise estatística</b> .....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	37
<b>5.1</b>	<b>Desenvolvimento ponderal</b> .....	37
<b>5.2</b>	<b>Consumo relativo de ração</b> .....	40
<b>5.3</b>	<b>Consumo relativo de água</b> .....	43
<b>5.4</b>	<b>Peso relativo dos órgãos</b> .....	46
<b>5.5</b>	<b>Parâmetros reprodutivos</b> .....	47
<b>5.6</b>	<b>Análise histopatológica</b> .....	48

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>6.1</b>	<b>Parâmetros reprodutivos</b> .....	49
<b>6.2</b>	<b>Peso de órgãos</b> .....	51
<b>6.3</b>	<b>Consumo de água</b> .....	51
<b>6.4</b>	<b>Consumo alimentar e desenvolvimento ponderal</b> .....	52
<b>6.5</b>	<b>Toxicidade materna</b> .....	53
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	54
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55
	<b>ANEXO A - Laudo comercial da oleuropeína</b> .....	64
	<b>ANEXO B - Análise química da amostra de oleuropeína</b> .....	69
	<b>ANEXO C - Carta de aprovação CEUA - UFRGS</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais foram a base da medicina tradicional por milhares de anos, estudos arqueológicos revelaram que o homem faz seu uso com fins medicinais há pelo menos 6.000 anos (PAN *et al.*, 2014). A pesquisa moderna, vem confirmando a importância dessas substâncias através da descoberta de inúmeras moléculas e seus mecanismos de ação, de modo que muitas delas servem como base para a produção de medicamentos sintético (BRASIL, 2004; COLALTO, 2018; LOMBARDO, 2018). Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos disponíveis no mercado sejam derivados direta ou indiretamente de princípios ativos de origem vegetal (WHO, 2011). Em muitos países em desenvolvimento, grandes proporções da população ainda dependem das práticas de medicina tradicional e do uso de plantas medicinais como uma alternativa para atender as suas necessidades de saúde. Embora a medicina “moderna” exista em paralelo com essas práticas tradicionais, a medicina com bases em plantas mantêm sua popularidade devido a fatores culturais e históricos (VISHWAKARMA *et al.*, 2013).

Medicamento fitoterápico é definido como aquele obtido exclusivamente através do emprego de matérias-primas ativas vegetais (BRASIL, 2004; LOMBARDO, 2018). As legislações brasileira e internacional, exigem que fitoterápicos e fármacos sejam produzidos ou disponibilizados no mercado para consumo somente após a avaliação rigorosa de suas características. Para tal, testes que determinem suas atividades toxicológicas e seu potencial mutagênico se fazem necessários (OLIVEIRA; ROPKE, 2016). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regula o registro desses medicamentos para uso humano e prevê a realização de estudos de toxicidade pré-clínica. A nível mundial, o mercado de fitoterápicos gira valores em torno de US\$ 44 bilhões, as estimativas no Brasil variam entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões (BRASIL, 2012).

A *Olea europaea* L. (oliveira) é uma árvore frutífera nativa do mediterrâneo, pertencente à família botânica *Oleaceae*. Seu uso terapêutico tem uma longa história na medicina tradicional, e desde tempos antigos é conhecida por suas propriedades medicinais. É importante componente da dieta do mediterrâneo, tendo ações já reconhecidas na diminuição da pressão arterial, estresse oxidativo e na melhora no perfil lipídico, de modo a ser associada com aumento da expectativa de vida e diminuição de taxas de mortalidade devido a doenças cardiovasculares (WALKER, 2009; MARTINEZ-GONZALEZ *et al.*, 2009; COVAS, 2007; HUANG, 2008).

A oleuropeína é o composto fenólico predominante na *Olea europaea* L., presente em todas as partes da planta e em maior concentração nas folhas, ela vem recebendo grande atenção da comunidade científica, devido a suas propriedades farmacológicas já descritas, como, ação antioxidante, antiinflamatória, antineoplásica e atividade frente a diferentes microrganismos, de modo que pode ser encontrado para venda em países mediterrâneos como suplemento alimentar (HASHMI *et al.*, 2015a; OMAR, 2010; PINHEIRO; MELLO, 2012; TÜRKEZ; TOĞAR, 2011).

No Brasil, a olivicultura encontra-se em ascensão, uma vez que o país produz apenas 1 % de todo azeite que consome. A nível nacional, os cultivares ocupam cerca de 7.000 hectares, sendo 4.500 localizados no Rio Grande do Sul segundo o SEBRAE-RS. A produção anual de azeite depende muito das condições climáticas e em 2019 o país atingiu a marca histórica de 260 mil litros segundo a SEAPA-RS, sendo que desses 198,664 mil litros foram produzidos no estado, a partir de 1,7 milhão de toneladas de azeitona (SEAPA, 2021; SEBRAE-RS, 2021). O cultivo de oliveiras, bem como a produção de azeite, gera uma grande quantidade de resíduos, que vão desde os resíduos da poda e colheita até o bagaço, resultante da produção do azeite. De maneira geral, são necessários 100 kg de azeitona para a produção de 20 kg de azeite, os 80 kg de resíduos restantes podem ser utilizados de diferentes formas, como na alimentação animal, devido ao seu alto valor energético, herbicida, adubo, óleo residual, extração de componentes orgânicos (pectina, enzimas e antioxidantes), entre outros. O uso e destino correto desses resíduos, envolve além de preocupações ambientais, um grande potencial econômico (MEDEIROS *et al.*, 2016; SEBRAE-RS, 2021; SEAPA-RS, 2021; VERA *et al.*, 2009).

Infecções fúngicas vem ganhado importância nas últimas décadas, devido principalmente ao aumento da ocorrência em pacientes imunocomprometidos e devido as crescentes taxas de mortalidade e morbidade associadas a doença (MENDES *et al.*, 2017). As poucas opções de medicamentos para o tratamento dessas infecções, faz com que o surgimento de resistência a qualquer uma das classes de antifúngicos, resulte em importantes limitações terapêuticas aos pacientes, uma vez que restam ainda menos opções de escolha (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). Nesse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de pesquisas na busca de moléculas novas e mais efetivas no combate das micoses. Estudos utilizando diferentes plantas vem mostrando resultados promissores para o problema (ABKHOO; JAHANI, 2016; SALHI *et al.*, 2017).

Nosso grupo de pesquisa vem, há anos, desenvolvendo estudos com o intuito de testar a eficácia de diferentes substâncias naturais frente a agentes fúngicos patogênicos. Podendo-se destacar pesquisas com Própolis (*Apis mellifera*), Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), Orégano (*Origanum vulgare* L.) e Manjerona (*Origanum majorana* L.) frente a agentes como os da esporotricose (*Sporothrix brasiliensis*), aspergilose (*Aspergillus spp.*) e candidíase (*Candida albicans*). Nos estudos são compreendidos ensaios *in vitro* e *in vivo*, incluindo a caracterização dos componentes presentes nos compostos naturais utilizados, ensaios de mutagenicidade, avaliações dos potenciais de toxicidade e testes, tanto com doenças fúngicas induzidas, como no tratamento de casos clínicos (CLEFF *et al.*, 2008; CLEFF *et al.*, 2013; DANTAS *et al.*, 2016; HOLLENBACH *et al.*, 2014; HOLLENBACH *et al.*, 2015; OSÓRIO *et al.*, 2019; SANTIN *et al.*, 2014; WALLER *et al.*, 2016; WALLER *et al.*, 2017). Mais recentemente, foi realizado um estudo *in vitro* testando a ação de extratos aquosos do bagaço de diferentes variedades da *Olea europaea* L., frente a fungos do gênero *Candida* spp., Complexo *Sporothrix schenckii* e dermatófitos, com resultados de inibição contra duas cepas padrões de *Candida albicans* em concentrações a partir de 3,12 mg/ml (RIPOLL, 2019).

Os estudos mais comumente utilizados para avaliação da toxicidade reprodutiva são divididos em três segmentos, adaptando-se das normas da ANVISA em conjunto com normas internacionais guiadas pela Environmental Protection Agency (EPA) e recomendadas pela OECD e FDA. Os estudos pré-clínicos em modelos animais, etapas que incluem os ensaios toxicológicos previstos nesse projeto, tem como objetivo apontar substâncias que tenham capacidade de alterar aspectos fisiológicos sobre a reprodução, fertilidade e comportamento da prole em mamíferos. A exposição de ratos Wistar a oleuropeína nesse estudo, visou os possíveis efeitos deletérios da sua administração de maneira crônica sobre parâmetros sistêmicos e reprodutivos dos animais, de forma a contribuir para a sua caracterização toxicológica, afim de viabilizar seu uso terapêutico seguro.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar os potenciais riscos toxicológicos da utilização da oleuropeína (composto fenólico majoritário da *Olea europaea*), no que se refere à toxicidade crônica e reprodutiva em ratos Wistar, contribuindo para a elucidação de questões relacionadas à segurança do seu uso como agente terapêutico, que poderiam restringir ou impossibilitar seu uso como insumo farmacêutico.

### **2.2 Objetivo específico**

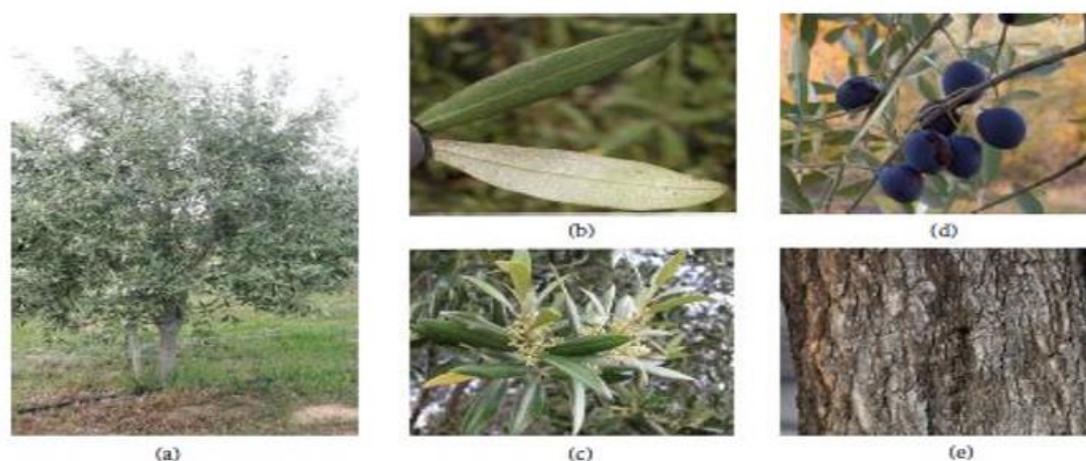
Avaliar os efeitos da oleuropeína (composto fenólico majoritário da *Olea europaea*) sobre a fertilidade de ratos Wistar, machos e fêmeas, formação e maturação espermática, acasalamento, fertilização, desenvolvimento pré-natal, gestação, parto, lactação e parâmetros sistêmicos (Segmento I).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Caracterização botânica

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore frutífera pertencente à família botânica *Oleaceae*, sendo a única representante da espécie com frutos comestíveis, a azeitona, de onde é extraído o azeite de oliva. A planta pode atingir de 6-9 metros de altura (Figura 1 - a). As folhas de até 7,5 cm de comprimento, são simples, espessas e coriáceas, estreitas em sentidos opostos, lanceoladas ou lineares, com margens inteiras e pontas agudas de um verde acinzentado na parte superior, a parte inferior é mais clara e contém pelos finos e brancos parecidos com escamas (Figura 1 - b). As flores são numerosas, pequenas, de coloração branco amarelado (Figura 1 - c). A oliva ou azeitona, possui caroço duro de formato ovoide, o fruto normalmente tem de 1 a 2,5 cm de comprimento (Figura 1 - d). A casca tem coloração cinza pálida (Figura 1 - e). (HMPC, 2011; HASHMI *et al.*, 2015b; PINHEIRO; MELLO, 2012). É uma das plantas cultivadas mais antigas do planeta, originária da bacia do mediterrâneo, e disseminada por muitos países da Europa e Oriente Médio. É uma planta adaptada ao clima temperado, necessitando de baixas temperaturas e índices pluviométricos adequados no período que antecede a floração para a ocorrência de produções satisfatórias (PINHEIRO; MELLO, 2012).

Figura 1 - *Olea europaea* L.: (a) árvore; (b) folhas; (c) flores; (d) frutos; (e) casca.



Fonte: Hashmi et al., 2015.

A oliva quando madura, pode ser usada para extração de azeite, ou consumida in natura. O azeite é um líquido amarelo escuro, transparente e aromático, utilizado desde tempos antigos na culinária. O termo azeite, refere-se ao produto extraído dos frutos da oliveira, enquanto o óleo é tido pela extração das sementes, utilizando-se solventes (PINHEIRO; MELLO, 2012).

Atualmente, no Brasil, cultivares de oliveira das variedades Arbequina, Arbosana, Picual, Koroneiki, Grapollo, Ascollana, Frantoio e Manzanilla são encontrados nos estados de Santa Catarina, São Paulo e também com expressivas áreas plantadas no sul de Minas Gerais e no oeste e metade sul do Rio Grande do Sul (COUTINHO *et al.*, 2009; PINHEIRO; MELLO, 2012).

### **3.2 *Olea europaea* L. (oliveira)**

A *Olea europaea* L. é um importante componente da dieta do Mediterrâneo, conhecida por suas ações na diminuição da pressão arterial e estresse oxidativo e melhora no perfil lipídico, de modo a ser associada com aumento da expectativa de vida e responsável por diminuir taxas de mortalidade relacionadas a doenças cardiovasculares. A planta vem ganhando grande atenção devido a sua capacidade de modular a resposta inflamatória, a qual tem um papel importante nos processos de envelhecimento no aparecimento de determinadas neoplasias, atividade atribuída principalmente aos seus compostos fenólicos (WALKER, 2009; MARTINEZ-GONZALEZ *et al.*, 2009; COVAS, 2007; HUANG, 2008).

O uso terapêutico da *O. europaea* L. tem longo histórico na medicina tradicional e contemporânea, para uma grande gama de condições, e sendo as diferentes partes da planta, como a azeitona, as folhas e as sementes usadas de diversas formas, sozinhas ou associadas a ervas ou a outras substâncias (HASHMI *et al.*, 2015a), alguns dos exemplos de suas aplicações podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1 - Usos tradicionais e contemporâneos da *Olea europaea*

<b>Partes da planta/preparação usada</b>	<b>Doença/uso</b>
Folhas e azeitonas/infusão e maceração	Hipoglicemiante /hipotensivo
Decocção/infusão de azeitonas e folhas	Antidiabético
Azeite de oliva + suco de limão	Tratamento de colelitíase
Óleo das sementes / via oral	Laxante
Decocção de folhas secas e azeitonas/ oral	Diarreia, infecções do trato respiratório e urinário
Azeite de oliva/aplicado no couro cabeludo	Previne queda de cabelo
Extrato fervido de folhas frescas/uso oral	Tratamento da asma
Extrato fervido de folhas frescas/uso oral	Tratamento da hipertensão
Extrato de folhas em água quente	Diurético
Azeite de oliva	Uso em fraturas
Infusão de folhas/uso oral	Antipirético
Azeitonas	Limpeza de pele
Infusão de folhas/uso oral	Antinflamatório, tônico
Preparado de folhas	Tratamento de gota
Folhas da <i>O.europaea</i>	Antibacteriano
Decocção de folhas	Antidiabético, anti-hipertensivo
Azeitonas e folhas	Tratamento de hemorroidas, reumatismo e vasodilatador
Infusão e folhas	Tratamento de infecções oculares

Fonte: Tabela adaptada de Hashmi *et al.*, 2015.

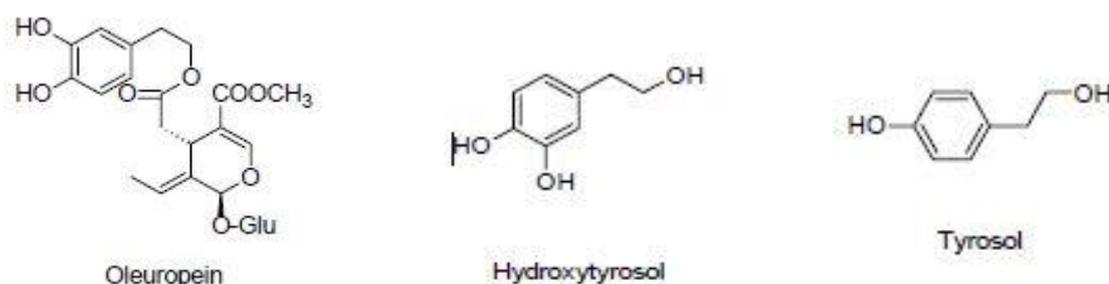
### 3.3 Oleuropeína

A oleuropeína, foi citada pela primeira vez em 1908 por Bourquelot e VintileSCO, porém sua estrutura somente foi descrita em 1960 por Pannizi *et al.* Pertencente ao grupo dos polifenóis chamados de secoiridóides, sua molécula possui 3 subunidades: um polifenol chamado de 4-(2-hidroxietil) benzeno-1,2-diol (também chamado de hidroxitirosol), um secoiridóide chamado de ácido elenóico e uma molécula de glicose (BOURQUELOT; VINTILESCO, 1908; PANNIZI *et al.*, 1960; OMAR SH., 2010).

Se trata de um complexo fenólico, presente em grandes concentrações nas folhas da oliveira e em menor quantidade na azeitona, sendo responsável pelo gosto amargo e aroma pungente característicos do óleo de oliva. É pertencente ao grupo dos secoiridóides os quais são abundantes nas famílias *Oleaceae*, *Cornaleae*, *Gentianaceae*, bem como em diversas outras plantas. A oleuropeína e seus derivados hidroxitirosol e tirosol (Figura 2), são os principais compostos fenólicos presentes na oliveira, sendo considerados os principais responsáveis pelo seu efeito terapêutico (KAEIDI *et al.*, 2011). As quantidades de oleuropeína podem alcançar quantidades maiores a 140 mg/g de matéria seca (SOLER-RIVAS, 2000)

Diversos estudos tem sido realizados com a oleuropeína quanto ao seu isolamento, caracterização, síntese e avaliações *in silico*, de forma com que esta pode ser utilizada para padronização química da oliveira e seus extratos de interesse medicinal (HASHMI *et al.*, 2015)

Figura 2 - Estrutura química da oleuropeína e hidroxitirosol e tirosol



Fonte: retirado de Omar, 2010.

### 3.3.1 Atividades da oleuropeína

A oleuropeína tem diversas propriedades farmacológicas descritas, dentre as quais pode-se destacar a atividade antioxidante, antiinflamatória, antiaterosclerótica, anticâncer, antimicrobiana, antiviral e antifúngica. Além disso, também já foram demonstrados efeitos cardioprotetores, atividade hipolipêmica, antisquêmica e hipoglicêmica (ANDREADOU *et al.*, 2006.; HAMDI; CASTELLON, 2005; CARLUCCIO, 2013; CICERALE; LUCAS; KEAST, 2010 IVANOV *et al.*, 2018; KORUKLUOGLU *et al.*, 2006; MICOL *et al.*, 2005; POUDYAL; CAMPBELL; BROWN, 2010; SOLIMAN *et al.*, 2019; TRIPOLI *et al.*, 2005).

Dentre as diversas propriedades da oleuropeína, provavelmente a sua ação antioxidante seja a principal e uma das ações mais cedo documentadas, atuando muitas vezes de maneira dose-dependente na remoção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (JEMAI, 2008; OMAR, 2010). Recentemente foi demonstrada sua capacidade antioxidante frente a diferentes agressores como a rotenona, um pesticida (SARBISHEGI; ALHAGH CHARKHAT GORGICH; KHAJAVI, 2017) e também frente ao mancozeb, um fungicida (ASHKANANI *et al.*, 2020), exercendo proteção ao sistema reprodutivo masculino. Além de efeitos protetores em diferentes processos inflamatórios, como na injúria oxidativa renal, causada por síndrome de isquemia e reperfusão (NASRALLAH *et al.*, 2020).

Sua atividade antioxidante está em muitos estudos associada a outras atividades e muitas vezes citada como sendo responsável por tais ações, como seu poder hipoglicemiante. Em 2006, Al-Azzawie e Alhamdani demonstraram que a oleuropeína ao ser administrada em coelhos diabéticos, na dose de (20mg/kg) por 16 semanas, teve capacidade de reduzir níveis glicêmicos à níveis similares aos do grupo controle (AL-AZZAWIE, ALHAMDANI, 2006). Também foi capaz de atenuar danos testiculares em ratos com diabetes tipo II, sendo atribuída tal ação ao poder antioxidante e capacidade de modular a esteroidogênese testicular (SOLIMAN *et al.*, 2019). Um estudo realizado em 2011, demonstrou que o extrato de folhas de oliva atenuou a dor neuropática induzida por altos níveis de glicose, através da diminuição da apoptose neuronal *in vivo* e *in vitro*, atribuindo o efeito a seu poder antioxidante e hipoglicemiante do composto (KAEIDI *et al.*, 2011). O extrato de folhas de oliva, também se mostrou efetivo na diminuição da resistência insulínica em um estudo conduzido na Nova Zelândia, onde 46 homens de meia idade e acima do peso, receberam cápsulas de extrato de oliva, as quais apresentavam em média 12,7 mg de oleuropeína, ou placebo durante 12 semanas. Demonstrando um aumento de 15% na sensibilidade insulínica dos pacientes tratados quando comparado ao grupo placebo (DE BOCK, 2013).

Outra atividade relatada é sua ação diante de diferentes neoplasias (FÜRST; ZÜNDORF, 2015). Frente ao câncer de mama, a oleuropeína mostrou atividade protegendo as células contra danos genéticos induzidos e ação antioangiogênica (LIMAN *et al.*, 2017). Inibiu a proliferação de células tumorais humanas (CÁRDENO, 2013), e demonstrou indução de apoptose em linhagem de células humanas HeLa de carcinoma cervical (YAO., *et al.*, 2014).

Diversos estudos vem demonstrando sua atividade cardioprotetora, muitas vezes em conjunto com o hidroxitirosol. Sendo capaz de reduzir a extensão de infartos, concentração plasmática de lipídeos, marcadores de estresse oxidativo e diminuição da pressão arterial (BULOTTA *et al.*, 2014; CASTEJÓN *et al.*, 2020; POUDYAL; CAMPBELL; BROWN, 2010).

A oleuropeína e extratos de folhas já apresentaram ação contra diferentes microrganismos, como ação antibacteriana contra *Mycoplasma*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* (FURNERI, 2002; TASSOU; NYCHAS; BOARD, 1994; TASSOU; NYCHAS 1994 e 1995; TRANTER, 1993; SUDJANA *et al.*, 2009). Atividade antiviral contra o rhabdovírus (septicemia hemorrágica viral), para-influenza tipo 3 e vírus sincicial respiratório (MA *et al.*, 2001; MICOL *et al.*, 2005). Em 2000, a patente da oleuropeína foi requerida nos Estados Unidos, sendo alegado ação antiviral contra vírus da hepatite, herpes mononuclear, rotavírus, rinovírus bovino, parvovírus canino e vírus da leucemia felina (FREDRICKSON, 2000). Também apresenta atividade antifúngica, um estudo de Ripoll (2019), testou a ação de extratos aquosos do bagaço de diferentes variedades da *Olea europaea* frente a fungos filamentosos e leveduriformes, com resultados de inibição contra duas cepas de *Candida albicans* (RIPOLL, 2019), corroborando com o estudo feito por Markin *et al.* (2003), que também evidenciou que o extrato aquoso de folhas de oliveira teve ação contra a *Candida albicans*, além disso, foi demonstrada sua atividade contra o *Fusarium proliferatum* em testes *in vitro* (MUZZALUPO *et al.*, 2020).

### 3.3.2 Toxicidade da oleuropeína

Ainda são escassos os estudos quanto a toxicidade da oleuropeína e de extratos ricos em oleuropeína, embora suas atividades biológicas e seu uso tanto na medicina tradicional como na alimentação já sejam bastante difundidos (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015).

De modo geral, é aceito que o composto apresenta relativa segurança e não apresentava toxicidade em altas doses para humanos (KENDALL *et al.*, 2009). Cristian *et al.* em 2004, testaram a toxicidade aguda e crônica do HIDROX<sup>®</sup> (Hydrolyzed Aqueous Olive Pulp Extract) em ratos e camundongo, onde se determinou a NOAEL (no-observable-adverse-effect-level) com o limite de dose para administração oral de 2000

mg/kg, não sendo evidenciados sinais de toxicidade aguda, ou crônica, ocorrendo apenas um aumento na contagem de células vermelhas nos grupos que receberam doses de 1000 mg/kg/dia e 1500 mg/kg/dia. Porém, esse estudo diferiu do apresentado por Farag *et al.*, em 2003, onde ao administrar altas doses de compostos fenólicos da oliveira por 67 semanas causou significativo aumento nas enzimas hepáticas e na concentração total de lipídeos, bem como induziu danos nos tecidos hepáticos e renais (FARAG *et al.*, 2013).

Estudos posteriores também demonstram divergências, Arantes-Rodrigues (2011) demonstrou que a suplementação do extrato de folhas de oliva por 14 semanas, induziu alterações hepáticas significativas, hiperplasia de ductos biliares e colestase em camundongos, além de interferir negativamente na bioenergética hepática através da diminuição significativa no controle da taxa respiratória devido a efeitos desacoplativos. (ARANTES-RODRIGUES *et al.*, 2011). Em 2012, Omer *et al.*, descreveram que a administração de extrato de folhas de oliveira em ratos Wistar por 6 semanas a uma dose de 0,9%, induziu alterações hematológicas (anemia), anormalidades hepatocelulares, e renais, em contrapartida os animais que receberam o extrato apresentaram menores níveis de colesterol e glicose sanguínea (OMER *et al.*, 2012).

Mais recentemente, Clewel, *et al.*, (2016) atestaram a segurança do uso de um extrato comercial de *Olea europaea* L. (Bonolive®), realizando uma série de testes, onde não foram encontrados sinais de mutagenicidade nem aberrações cromossômicas em células de mamíferos nos testes *in vitro*, bem como não foram observadas alterações nos testes *in vivo* com camundongos que receberam doses de até 2000 mg/kg/dia, nem nos ratos Wistar que receberam doses repetidas por 90 dias de 300, 600 e 1000 mg/kg/dia (CLEWELL *et al.*, 2016). Todavia, é de suma importância que estudos continuem sendo realizados afim de comprovar sua eficácia e segurança, bem como a determinação de doses adequadas, com a utilização de mais modelos *in vivo* e ensaios clínicos (HASSEN; CASABIANCA; HOSNI, 2015).

### 3.3.3 Avaliação toxicológica

A legislação brasileira e internacional exige que fármacos, bem como os fitoterápicos, sejam produzidos ou disponibilizados no mercado para consumo, somente após a avaliação rigorosa de suas características. Para tal, devem ser realizados testes que determinem suas atividades toxicológicas e seu potencial mutagênico (SILVA *et al.*, 2003). As exigências quanto as avaliações necessárias para a regulamentação de fármacos e fitoterápicos, diferem nos diversos países ou blocos econômicos, mas em geral, os principais protocolos seguidos são os emitidos pela Europa através da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) e pelos Estados Unidos da América através do Food and Drug Administration (FDA) (SILVA *et al.*, 2003).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regula o registro de medicamentos fitoterápicos para uso humano e prevê a realização de estudos de toxicidade pré-clínica. O guia emitido por esse órgão, indica métodos padronizados para estudos de toxicidade pré-clínica para fitoterápicos, incluindo toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas (longa duração), e avaliação toxicológica de medicamentos fitoterápicos de uso tópico. De modo que, ensaios de toxicidade reprodutiva, são necessários quando o medicamento for indicado para gestantes ou uso de longa duração (ANVISA, 2004). Frente ao uso empírico da população e as constantes pesquisas na área, a ANVISA vem instituindo regras atualizadas para a regulamentação dessas substâncias, dispondo sobre boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e officinais de plantas medicinais e fitoterápicos (RDC n. 13 de 2013), e sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos (RDC n.26 de 2014) (ANVISA, 2013; ANVISA, 2014).

Essa regulamentação é de suma importância, uma vez que inúmeras substâncias de origem vegetal, apresentaram potencial teratogênico em experimentos em animais (CAMPESATO, 2005). O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão responsável pelo registro de medicamentos de uso veterinário, faz as mesmas exigências quanto a avaliação toxicológica, descritas no Decreto 5.053 de 2004 e Portaria 54 de 1999 (BRASIL, 2004).

### 3.3.4 Testes de toxicidade reprodutiva

A avaliação toxicológica reprodutiva compreende um estudo complexo. Reprodução pode ser descrito como o processo biológico que garante a continuidade das espécies, possibilitando que o material genético existente seja passado às gerações seguintes. Dessa maneira, o ciclo reprodutivo não versa apenas na concepção, gestação e nascimento, mas tem início com a produção dos gametas, continuando pela fertilização e desenvolvimento embrionário, nascimento e desenvolvimento pós natal, até a maturidade sexual, quando o descendente torna-se um adulto capaz de procriar (MELLO, 2007).

O ciclo reprodutivo e suas diferentes fases podem ser afetados por agentes químicos, que podem inibir ou afetar temporariamente a reprodução e/ou causar defeitos de desenvolvimento na prole exposta. Nas fases pré e pós-natal, o sistema nervoso central e os órgãos sexuais que ainda estão sofrendo diferenciação, podem ser afetados por substâncias presentes no sangue materno, através da placenta durante a gestação e do leite durante a amamentação (ZENICK; CLEGG, 1989). Dessa maneira, os estudos de toxicidade reprodutiva devem abranger igualmente todas as fases do ciclo reprodutivo, para que se possa detectar diferentes tipos de agravos que possam vir a afetá-las (LÊMONICA, 2001).

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

- Segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva” para avaliação de efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento;
- Segmento II “Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade” no qual ocorre a exposição da progênie durante a fase de organogênese;
- Segmento III “Toxicidade peri e pós-natal” onde são avaliados os efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante a fase de desenvolvimento fetal e lactacional.

Para estudos de toxicologia, frequentemente utilizam-se ratos Wistar, uma linhagem de ratos albinos que são preconizados por serem animais dóceis e por possuírem excelente desempenho reprodutivo (EBISUI *et al.*, 2009).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Insumos

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

### 4.2 Protocolo Experimental de Toxicidade Crônica e Reprodutiva (Segmento I)

#### 4.2.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*), 40 machos e 120 fêmeas nulíparas, com idade inicial de 90 dias, com padrão sanitário convencional, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil).

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos no CREAL, sendo previamente adaptados, por 7 dias e mantidos sob ambiente com umidade relativa e temperatura controladas ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; 30-70% UR), com ciclo de 12 horas luz/escuro, dieta padrão Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum*. Os animais permaneceram individualizados, em caixas de polipropileno (40x33x18 cm) com fundo coberto de maravalha, exceto durante o período de acasalamento, onde 3 fêmeas eram colocadas na gaiola moradia de cada macho. Todas as fases do experimento, foram realizadas de acordo com normas e princípios éticos do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA, UFRGS, Protocolo n. 37279/2019) – Anexo C.

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

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

#### 4.2.2 Delineamento experimental

O número de animais utilizados seguiu os protocolos de toxicidade reprodutiva aprovados pelos órgãos regulamentadores FDA, OECD e ANVISA, sendo instituídos quatro grupos experimentais:

Grupo I: G1 – Tratado com 500 mg/kg/dia de oleuropeína em pó diluída em água destilada, n = 10 machos e 30 fêmeas.

Grupo II: G2 - Tratado com 1000 mg/kg/dia de oleuropeína em pó diluída em água destilada, n = 10 machos e 30 fêmeas.

Grupo III: G3 - Tratado com 2000 mg/kg/dia de oleuropeína em pó diluída em água destilada, n = 10 machos e 30 fêmeas.

Grupo VI: CN - Tratado com água destilada (veículo), n = 10 machos e 30 fêmeas.

Foram utilizadas três doses espaçadas geometricamente, conforme recomendado pela OECD/OCDE (2001) e FDA (1994). Segundo a OECD/OCDE (2001), deve ser escolhida a menor dose que não tenha produzido qualquer toxicidade materna ou no desenvolvimento fetal (NOAEL), a dose intermediária que tenha apresentado mínimos efeitos tóxicos observáveis e a dose mais alta que tenha produzido alguma toxicidade (sinais clínicos ou diminuição do peso corporal), mas que não tenha causado sofrimento grave aos animais. As dosagens utilizadas (500mg/kg/dia, 1000 mg/kg/dia e 2000 mg/kg/dia) foram definidas com base no estudo realizado por Christian *et al.* (2004), onde foi estabelecida a dose NOAEL de 2000 mg/kg/dia para estudos com doses repetidas em ratos tratados com extrato aquoso de polpa de oliva (CHRISTIAN *et al.*, 2004).

#### 4.2.3 Tratamento

Todos os animais foram tratados diariamente, por via oral, com volumes idênticos em todos os grupos, através de sonda gástrica flexível em volume correspondente a 10 ml/kg. A diferença foi a dose de oleuropeína na solução administrada: 500 mg/kg/dia, 1000 mg/kg/dia e 2000 mg/kg/dia. O pó de oleuropeína foi diluído em água destilada (veículo) uma vez por semana e mantido sob refrigeração.

Os machos foram tratados por 70 dias antes e 21 dias durante o acasalamento, enquanto as fêmeas foram tratadas por 14 dias antes do acasalamento, durante o acasalamento (máximo de 21 dias), durante a gestação (21 dias) e até o final da lactação (21 dias pós-parto). Todos os animais foram mantidos em caixas individuais de polipropileno medindo 40 x 33 x 18 contendo maravalha, durante o período de experimentação.

#### 4.2.4 Acasalamento

O período de acasalamento foi realizado em três ciclos de cinco dias consecutivos e intervalo de 48 horas entre eles, totalizando 21 dias. Três fêmeas virgens e nulíparas foram alocadas na caixa de cada um dos machos, permanecendo no local durante duas horas por dia (das 5h00min às 7h00min) correspondente ao final do ciclo escuro. Após este período, os animais foram separados e a confirmação da concepção ocorreu mediante observação da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal das fêmeas. A avaliação citológica foi realizada diariamente, através de lavado vaginal e visualização em aumento de dez vezes com auxílio de microscópio óptico. Vinte e quatro horas após a constatação de esfregaço vaginal positivo, foi considerado o primeiro dia de gestação.

#### 4.2.5 Lactação

No 1º dia pós natal as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes. No 21º dia de lactação, ocorreu o desmame, sendo as fêmeas eutanasiadas e os filhotes destinados ao projeto intitulado “Avaliação da Toxicidade Peri e Pós-Natal (segmento III) da Oleuropeína em ratos Wistar, projeto previamente aprovado pelo CEUA - UFRGS, Protocolo número 37284/2019.

#### 4.2.6 Eutanásia e avaliação dos machos

Os machos foram eutanasiados por sobredosagem do anestésico isoflurano, 48 horas após o término do período de acasalamento. Esse período de 48 horas, é o período necessário para a recuperação quantitativa adequada das células reprodutivas dos machos, de modo que esse período se faz necessário para que não haja diferença na avaliação quantitativa (número de espermatozoides e número de espermátides), daqueles machos que cobrirem as fêmeas no dia do término do acasalamento (dia 21), em relação àqueles que não realizarem a cobertura nesse dia, ocorrendo dessa maneira a uniformização entre os animais do grupo e também entre os grupos. Optou-se pelo uso do isoflurano devido a sua rápida ação. Os animais foram colocados em uma gaiola fechada, juntamente com um recipiente contendo algodão embebido com isoflurano (FANTONI *et al.*, 2011; CFMV, 2012; CONCEA, 2018). Após a eutanásia os animais foram submetidos à celiotomia, e mediante exposição da veia cava caudal, procedeu-se a coleta de 4 ml de sangue. O sangue foi transferido para um tubo de ensaio, onde permaneceu em temperatura ambiente até a retração do coágulo. Posteriormente, o sangue foi centrifugado, o soro removido do tubo, transferido para dois tubos *ependorff* e congelado.

Rins, fígado, baço e coração foram removidos e avaliados em relação a possíveis alterações macroscópicas. Os órgãos sexuais, testículos, epidídimos, ductos deferentes, próstata e vesícula seminal também foram removidos. A vesícula seminal foi esvaziada previamente a pesagem. A massa de cada órgão foi mensurada através de pesagem em balança analítica, e relacionada com a massa corporal do indivíduo, exceto os ductos deferentes.

A túnica albugínea e os vasos principais de cada um dos testículos foram removidos, e cada testículo foi triturado e homogeneizado em 10 mL de NaCl 0,9% contendo 0,05% de Triton X-100, em triturador tecidual Fisaton 720® a uma velocidade de 600 rpm, durante 1 minuto. O mesmo procedimento de homogeneização e trituração foi repetido com a cauda de cada um dos epidídimos dos animais, previamente cortados com tesoura em pequenos pedaços.

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

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

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

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

Onde:

S = soma total por animal

C = número de espermatozoides ou espermátides contados

FC = fator câmara (1,250)

V = diluição ( $10^6$ )

6,1 = Número de dias em que as espermátides em estágio IV e VIII são resistentes no epitélio seminífero de ratos.

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

Para análise histológica, os órgãos coletados de todos os animais foram fixados com solução de formalina tamponada e foram examinados no laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Animal, da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Os órgãos enviados ao setor de patologia foram desidratados, passando por uma série gradativa de soluções alcoólicas até 100% e acrescidos de parafina derretida até seu resfriamento. A parafina endurecida foi aparada em forma de bloco e cortada em fatias pelo micrótomo. Esses cortes foram lavados em xilol, para remoção da parafina, corados com hematoxilina e eosina e observados em microscópio óptico de 40, 100 e 400x, segundo a técnica de Ross *et al.* (1989).

#### 4.2.6.1 Dosagem de testosterona

As coletas de amostras sanguíneas foram obtidas a partir de venopunção da veia cava caudal dos machos, sob visualização direta, no dia da eutanásia. O sangue foi armazenado em tubos sem anticoagulante. Após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 2500 rpm, para obtenção de soro, sendo o mesmo acondicionado em microtubo e mantido a -20°C. A testosterona foi mensurada pelo método de quimioluminescência pelo laboratório TECSA – Tecnologia em Sanidade Animal, Belo Horizonte/MG – Brasil.

#### 4.2.7 Eutanásia e avaliação das fêmeas

As fêmeas foram eutanasiadas por sobredosagem de isoflurano, no 21º dia de lactação, usando-se o mesmo procedimento utilizado na eutanásia dos machos (FANTONI *et al.*, 2011; CFMV, 2012; CONCEA, 2018). Após a eutanásia os animais foram submetidos à celiotomia, sendo removidos e inspecionados o fígado, baço, rins, ovários, útero e coração. No útero foram contados os implantes uterinos presentes. Cada órgão foi pesado individualmente em balança analítica. Para análise histológica, os órgãos coletados de todos os animais foram fixados com solução de formalina tamponada e examinados no laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Animal, da Faculdade de Veterinária da UFRGS, conforme referido no item 4.2.6. As fêmeas que não emprenharam durante o período de acasalamento foram eutanasiadas da mesma maneira que os outros animais.

##### 4.2.7.1 Taxas reprodutivas

Para análise dos parâmetros reprodutivos maternos, foram calculadas as taxas reprodutivas, de acordo com a Environmental Protection Agency (EPA):

Taxa de acasalamento: Representada pela divisão entre o número de fêmeas com esfregaço vaginal positivo (presença de espermatozoides) e o número de fêmeas acasaladas vezes cem.

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de fêmeas com espermatozoides no esfregaço vaginal}}{\text{N}^\circ \text{ de fêmeas acasaladas}} \times 100$$

$$\text{N}^\circ \text{ de fêmeas acasaladas}$$

Taxa de gestação: Representada pela divisão entre o número de fêmeas prenhes e o número de fêmeas com esfregaço vaginal positivo (presença de espermatozoides) vezes cem.

Nº de fêmeas prenhes x 100

Nº de fêmeas com espermatozoides no esfregaço vaginal

Taxa de parto: Representada pela divisão entre o número de fêmeas paridas a termo e o número de fêmeas gestantes vezes cem.

Nº de fêmeas paridas a termo x 100

Nº de fêmeas prenhes

Taxa de natalidade: Representada pela divisão entre número total de filhotes nascidos vivos e o número total dos filhotes nascidos (vivos e/ou mortos) vezes cem.

Nº de filhotes nascidos vivos x 100

Nº de filhotes nascidos

Taxa de viabilidade: Representada pela divisão entre o número de filhotes que permaneceram vivos até o quarto dia de lactação e o número total de filhotes nascidos vivos vezes cem. O número de filhotes nascidos vivos utilizado foi o número obtido após a padronização das ninhadas que ocorreu no dia do nascimento, mantendo-se oito filhotes por ninhada.

Nº de filhotes vivos até o 4º dia de lactação x 100

Nº de filhotes nascidos vivos

Taxa de desmame: Representada pela divisão entre o número total dos filhotes até o 21º dia de lactação e o número total de filhotes nascidos vivos vezes cem. O número de filhotes nascidos vivos utilizado foi o número obtido após a padronização das ninhadas que ocorreu no dia do nascimento, mantendo-se oito filhotes por ninhada.

Nº de filhotes ao desmame x 100

Nº de filhotes nascidos vivos

Taxa de perda pós-implantação: Representada pela divisão entre o número resultante da subtração do número de sítios de implantação e o número de fetos nascidos, e o número total de sítios contados vezes cem.

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de (sítios de implantação – número de fetos nascidos)}}{\text{N}^\circ \text{ de sítios de implantação}} \times 100$$

Nº de sítios de implantação

#### 4.2.8 Variáveis avaliadas

##### Machos

- Massa corporal diária (g) durante 91 dias (antes e durante o acasalamento);
- Consumo diário de ração antes do acasalamento (g);
- Consumo diário de água antes do acasalamento (ml);
- Aparecimento de sinais de toxicidade sistêmica como: perda de peso progressiva e redução na ingestão de água e ração;
- Peso relativo (%) das vísceras no dia do sacrifício (fígado, baço, rins, coração, vesícula seminal, testículo, próstata e epidídimos);
- Número total de espermatozoides;
- Produção diária de espermatozoides;
- Percentual de alterações morfológicas nos espermatozoides;
- Análise histopatológica dos órgãos enviados;
- Dosagem hormonal (testosterona).

##### Fêmeas

- Massa corporal diária (g) durante o pré-acasalamento, gestação e lactação;
- Consumo diário de ração (g) no pré-acasalamento e gestação;
- Consumo diário de água (ml) durante o pré-acasalamento e gestação;
- Sinais de toxicidade sistêmica como: perda de peso progressiva e redução na ingestão de água e ração;
- Sinais de aborto, distocia e prolongamento do período gestacional;
- Peso relativo (%) dos órgãos ao final da lactação (fígado, rins, baço, coração, ovários e útero);
- Número de implantes uterinos;
- Percentual de mortalidade durante o experimento;
- Análise histopatológica dos órgãos enviados;

- Análise das taxas reprodutivas;
- Número de filhotes por ninhada;
- Peso das ninhadas ao nascer.

### **4.3 Análise estatística**

Os dados obtidos foram digitados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v. 20.0 para análise estatística, que incluiu a análise de variância de uma via (ANOVA), ANOVA de medidas repetidas e Teste de Fisher. A simetria das variáveis quantitativas foi verificada pelo teste de Kolmogorov Smirnov. As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram descritas pela média e o erro padrão da média. As variáveis quantitativas com distribuição normal foram comparadas entre os grupos pela Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste post hoc de Bonferroni ou post hoc de Turkey. Nas comparações dos grupos ao longo do tempo, foi utilizada a Análise de Variância para medidas repetidas (ANOVA de medidas repetidas), seguido do teste de Bonferroni para as comparações múltiplas. Foi considerado um nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ) para as comparações estabelecidas.

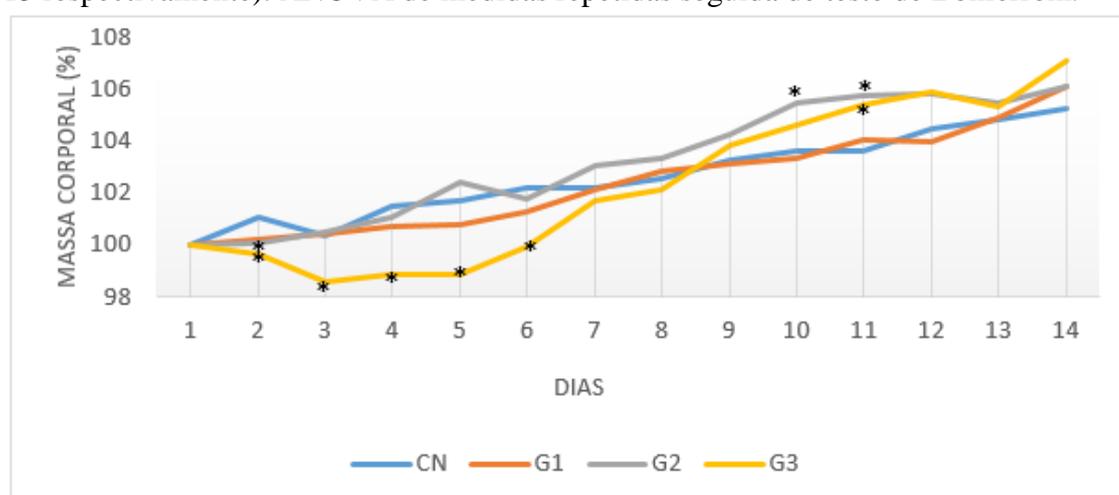
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Desenvolvimento ponderal

Os gráficos a seguir mostram a evolução da massa corporal das fêmeas, nos períodos de pré-acasalamento (14 dias), gestação (21 dias) e lactação (21 dias), e dos machos, nos períodos de pré-acasalamento (70 dias) e acasalamento (21 dias), ao serem tratados com oleuropeína em três concentrações (G1, G2 e G3) e do grupo controle negativo (CN) que recebeu apenas o veículo (água destilada). O peso de cada animal foi mensurado diariamente, e os dados estão representados na forma de porcentagem, sendo o peso dos animais no 1º dia de cada período considerado como 100%.

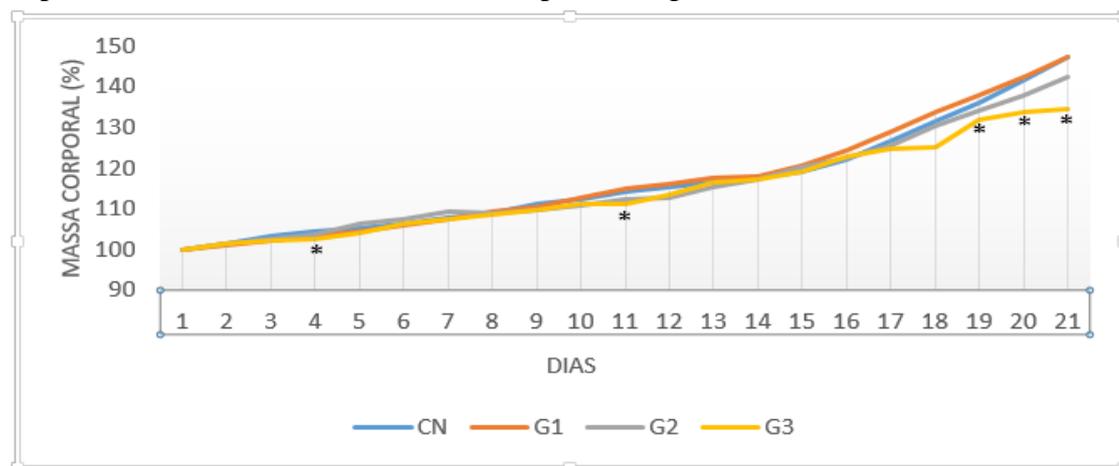
Em relação as fêmeas, não houve diferença estaticamente significativa no ganho de massa corporal entre o G1 e CN, em nenhum dos três momentos ( $P>0,05$ ). A Figura 3 demonstra a evolução da massa corporal das fêmeas no período pré-acasalamento (14 dias), mostrando que o G2 diferiu estatisticamente do CN nos dias 2, 10 e 11 ( $P<0,05$ ), sendo nos dias 10 e 11 o ganho de peso foi maior que o CN. O G3 diferiu do CN do 2º ao 6º e no dia 11º dia ( $P<0,05$ ).

Figura 3 - Evolução da massa corporal (%) de fêmeas tratadas com gua destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período pré-acasalamento. Dados expressos em média. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.



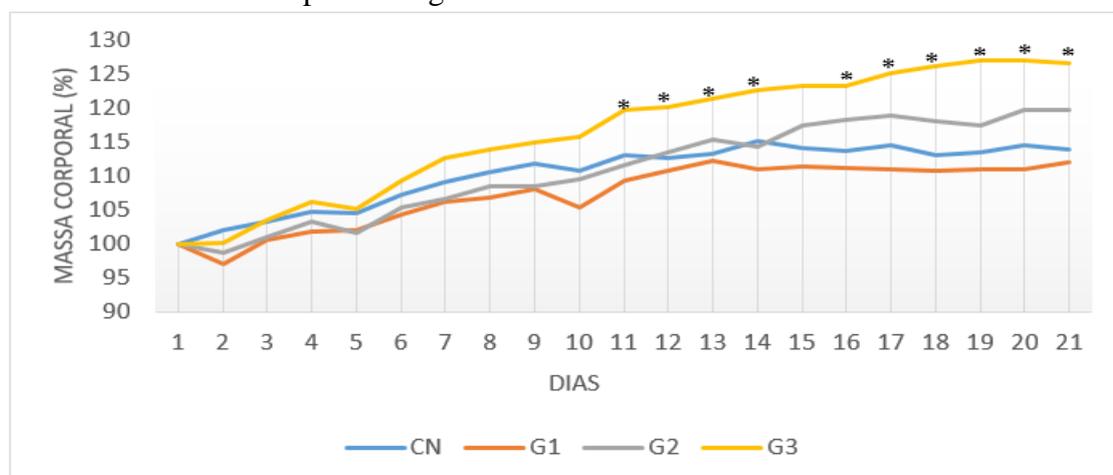
A Figura 4 mostra a evolução da massa corporal, das fêmeas durante o período de gestação (21 dias), houve diferença estatisticamente significativa entre o G3 do CN nos dias 4, 11, 19, 20 e 21 ( $P<0,01$ ), apresentando um menor ganho de massa pelas fêmeas do G3 nesses dias.

Figura 4 – Evolução da massa corporal (%) de fêmeas tratadas com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de gestação. Dados expressos em média. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.



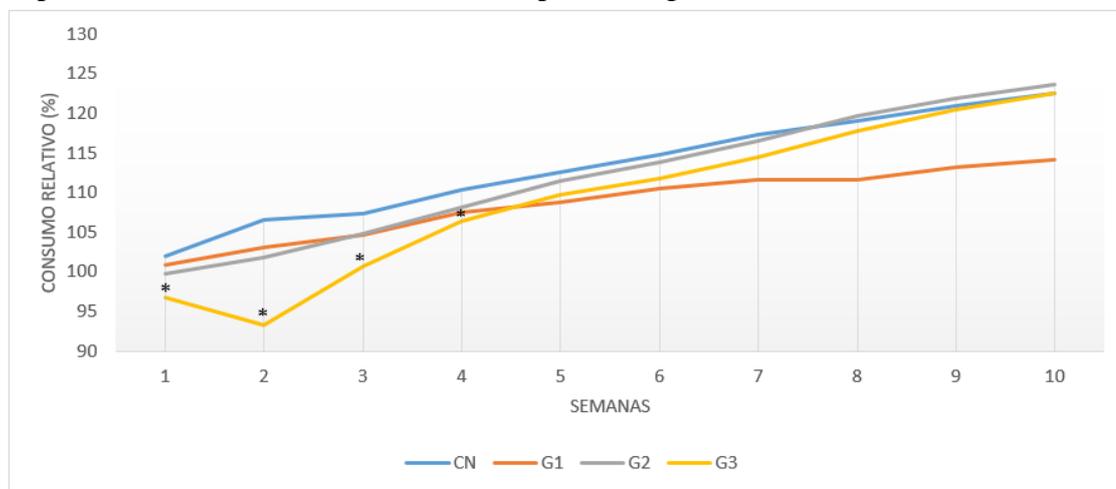
A Figura 5 mostra a evolução da massa corporal das fêmeas tratadas com oleuropeína durante o período de lactação (21 dias), onde pode se observar diferenças estatisticamente significativas entre G3 e CN a partir do 11º dia até o final do período experimental ( $P < 0,01$ ), sendo que em todos os momentos de divergência o G3 teve maior ganho de peso que o CN.

Figura 5 – Evolução da massa corporal (%) de fêmeas tratadas com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante a lactação. Dados expressos em média. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.



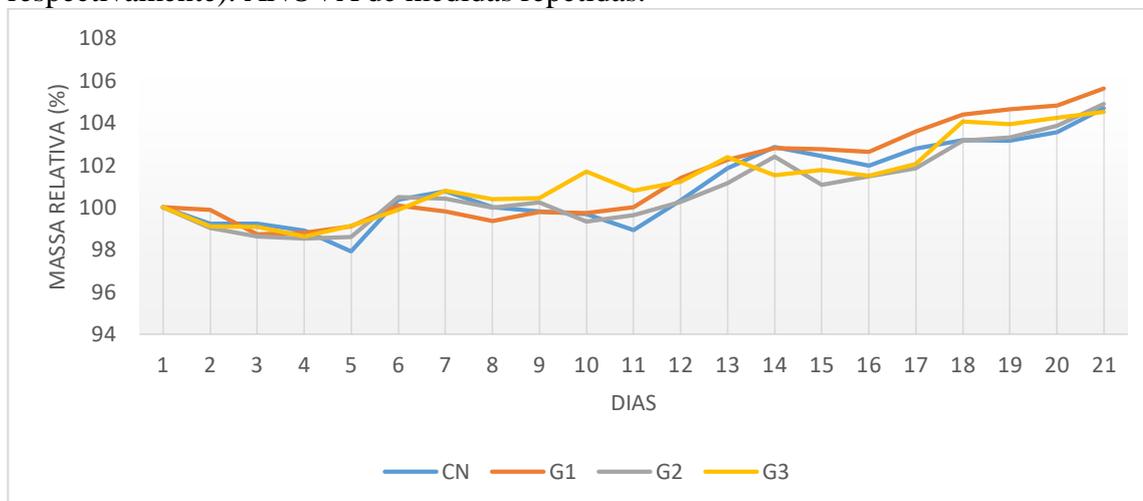
A Figura 6 demonstra a evolução da massa corporal dos machos no período pré-acasalamento (70 dias), mostrando que apenas o G3 diferiu estatisticamente do CN nas semanas 1 à 4 ( $P < 0,01$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na evolução do peso entre o G1 e G2 com relação ao CN nos dois momentos experimentais ( $P > 0,05$ ).

Figura 6 – Evolução da massa corporal (g) de machos tratados com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período pré-acasalamento. Dados expressos em média. ( $n=8, 7, 9$  e  $7$  respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.



A Figura 7 demonstra a evolução da massa corporal dos machos no período de acasalamento (21 dias), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P>0,05$ ).

Figura 7 – Evolução da massa corporal (g) de machos tratados com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de acasalamento. Dados expressos em média. ( $n=8, 7, 9$  e  $7$  respectivamente). ANOVA de medidas repetidas.

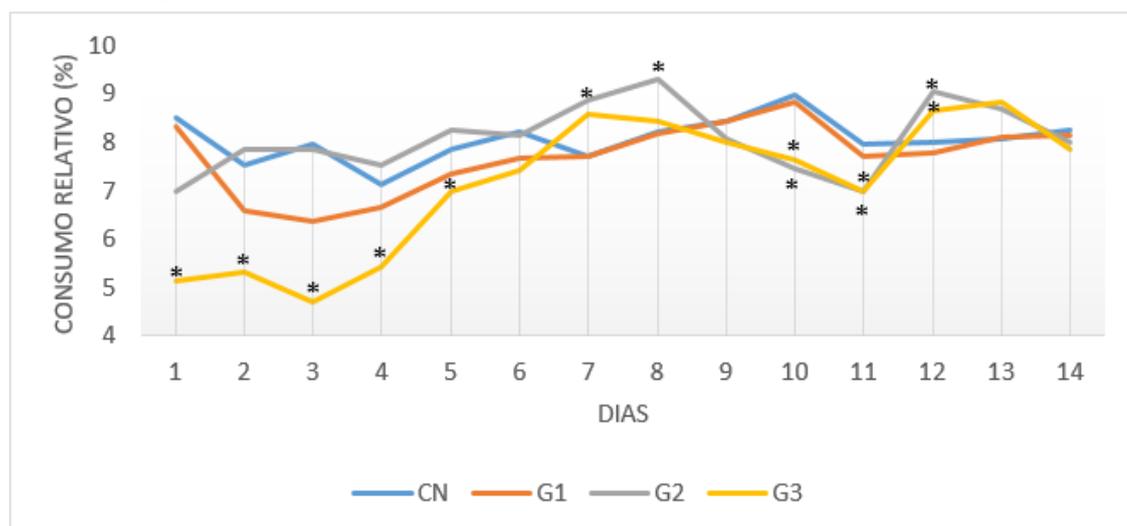


## 5.2 Consumo relativo de ração

Os gráficos a seguir mostram o consumo relativo de alimento das fêmeas, nos períodos de pré-acasalamento (14 dias), gestação (21 dias) e lactação (21 dias), e dos machos, nos períodos de pré-acasalamento (70 dias) e acasalamento (21 dias), ao serem tratados com oleuropeína em três concentrações (G1, G2 e G3) e grupo controle negativo (CN) que recebeu apenas o veículo (água destilada). O consumo de cada animal foi mensurado diariamente, e os dados estão apresentado na forma de consumo relativo (%), resultado da relação entre a quantidade específica consumida e o peso do animal x 100.

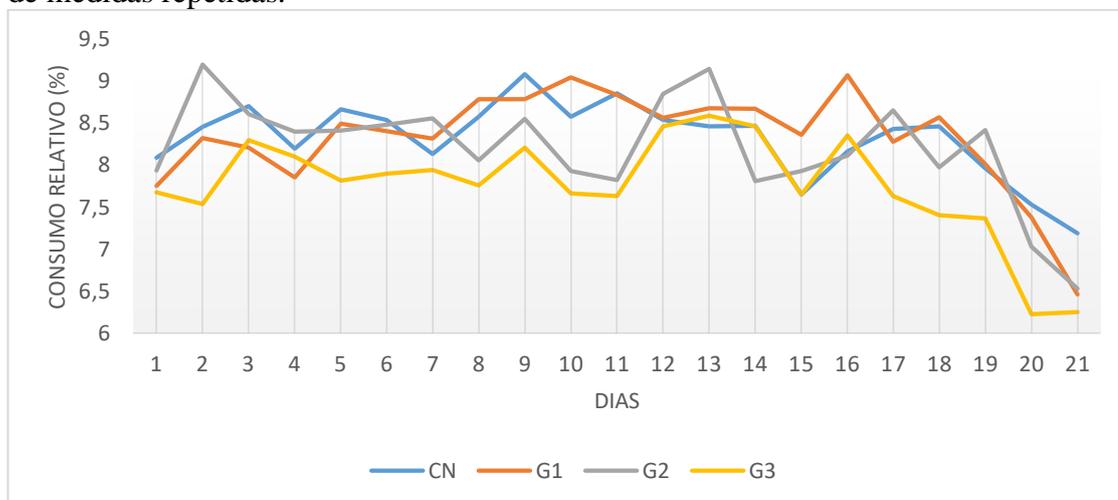
A Figura 8, mostra o consumo relativo de ração (%) das fêmeas, durante o período pré-acasalamento (14 dias). O G2 diferiu de forma estaticamente significativa do CN nos dias 7, 8, 10, 11 e 12 ( $P < 0,01$ ), enquanto que o G3 diferiu dos dias 1 ao 5 e 10 ao 12 ( $P < 0,01$ ).

Figura 8 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de fêmeas tratadas com água destilada (CN), e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período pré-acasalamento. Dados expressos em média. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida deteste de Bonferroni.



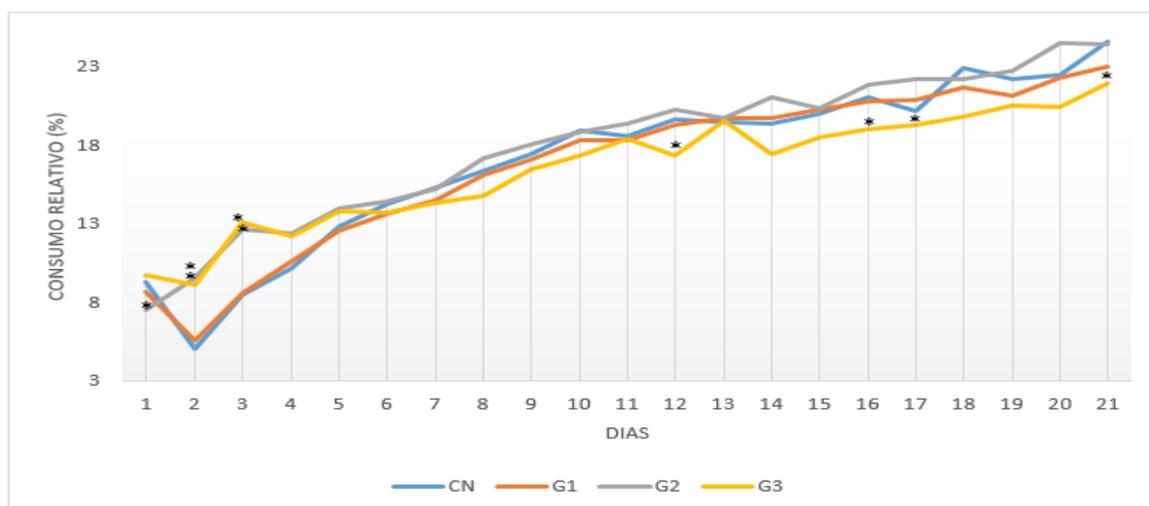
A Figura 9 mostra o consumo relativo de ração (%) das fêmeas durante o período de gestação (21 dias), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ).

Figura 9 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de fêmeas tratadas com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de gestação. Dados expressos em média. ( $n=14, 21, 13$  e  $15$  respectivamente). ANOVA de medidas repetidas.



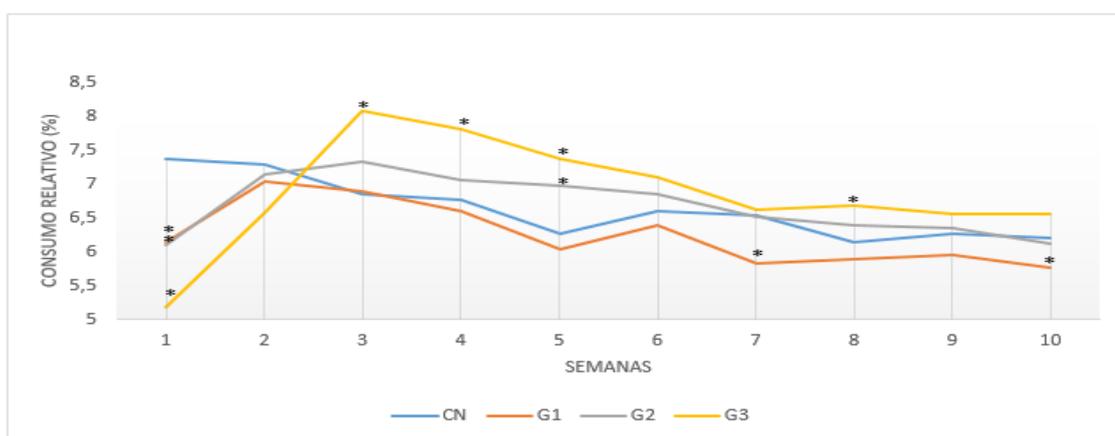
A Figura 10 mostra o consumo relativo de ração (%) das fêmeas durante o período de lactação, pode-se observar diferença estaticamente significativa do G2 em relação ao CN nos dias 1, 2 e 3 ( $P<0,05$ ), sendo o consumo nesses dias maior que o CN. O G3 diferiu estatisticamente do CN nos dias 2, 3, 12, 16, 17 e 21 ( $P<0,01$ ).

Figura 10 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de fêmeas tratadas com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de lactação. Dados expressos em média ( $n=14, 21, 13$  e  $15$  respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.



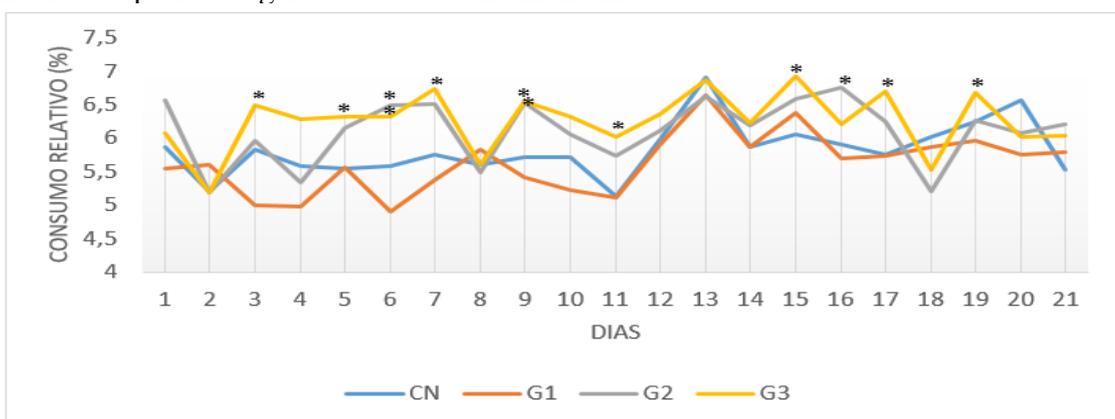
A Figura 11 mostra o consumo relativo de ração (%) dos machos, durante o período pré-acasalamento (70 dias). Todos os grupos tratamento diferiram de forma estatisticamente significativa do CN ( $P < 0,01$ ). O G1 diferiu estatisticamente do CN nas semanas 1, 7 e 10, enquanto o G2 diferiu estatisticamente do CN das semanas 1 e 5 e o G3 diferiu estatisticamente do CN nas semanas 1, 3, 4, 5 e 8.

Figura 11 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de machos tratados com água destilada (CN), e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de acasalamento. Dados expressos em média. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.



A Figura 12 mostra o consumo relativo de ração (%) dos machos, durante o período acasalamento (14 dias). O G2 diferiu estatisticamente do CN nos dias 6, 9 e 16 ( $P < 0,05$ ), enquanto que o G3 diferiu estatisticamente nos dias 3, 5, 6, 7, 9, 11, 15, 17 e 19 ( $P < 0,05$ ), sendo que em todos os dias citados os grupos G2 e G3 consumiram mais alimento que o CN.

Figura 12 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de machos tratados com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de acasalamento. Dados expressos em média. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.

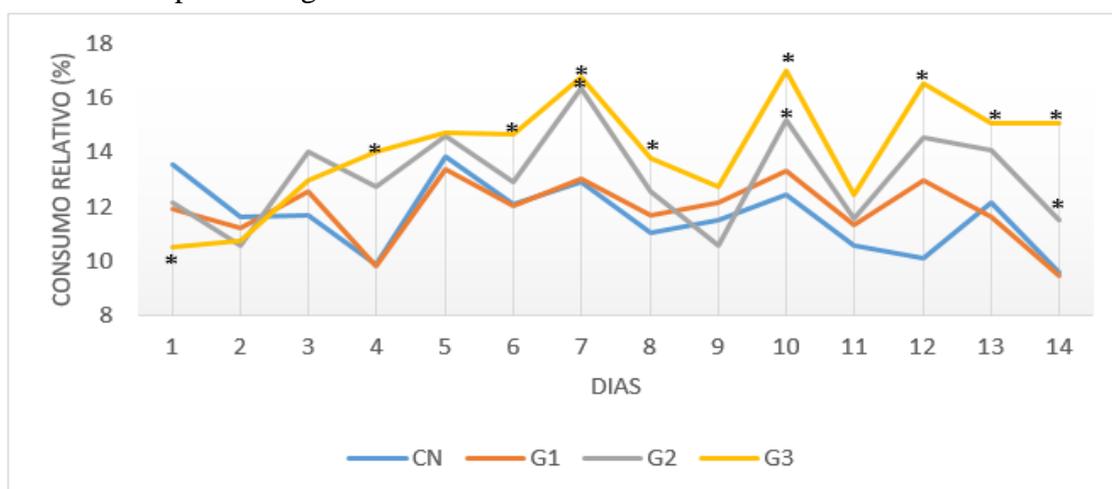


### 5.3 Consumo relativo de água

Os gráficos a seguir mostram o consumo relativo de água das fêmeas, nos períodos de pré-acasalamento (14 dias), gestação (21 dias) e lactação (21 dias), e dos machos, nos períodos de pré-acasalamento (70 dias) e acasalamento (21 dias), ao serem tratados com oleuropeína em três concentrações (G1, G2 e G3) e do grupo controle negativo (CN) que recebeu apenas o veículo (água destilada). Os consumo foram mensurado diariamente para cada animal e estão apresentado na forma de consumo relativo (%), resultado da relação entre a quantidade específica consumida e o peso do animal x 100.

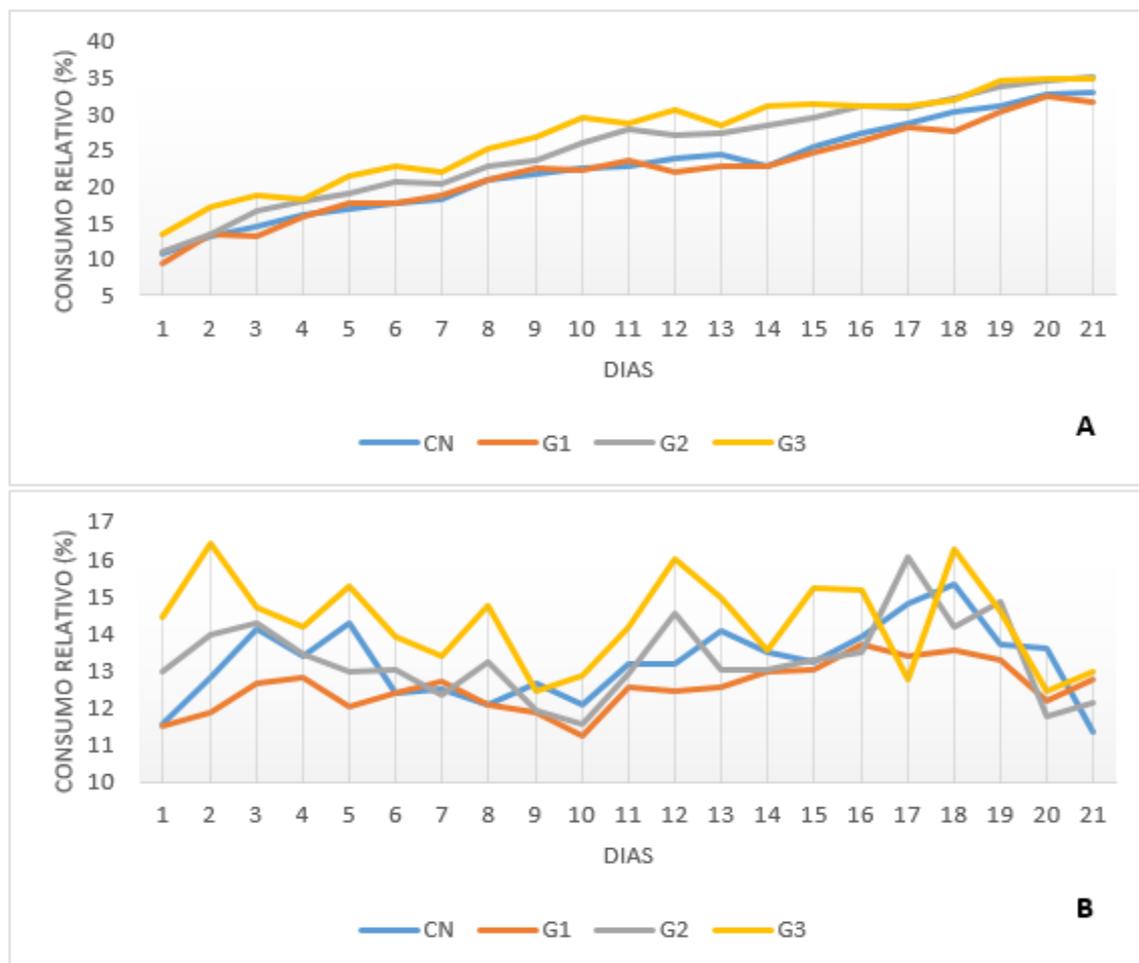
A Figura 13 mostra o consumo relativo de água (%) das fêmeas, durante o período pré-acasalamento (14 dias). O G2 diferiu estatisticamente do CN nos dias 7, 10 e 14 ( $P < 0,01$ ), enquanto que o G3 diferiu estatisticamente do CN nos dias 1, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13 e 14 ( $P < 0,01$ ), com exceção do primeiro dia do G3, em todos os demais dias citados os grupos G2 e G3 consumiram mais água que o CN.

Figura 13 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de água de fêmeas tratadas com Água destilada (CN), e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de pré-acasalamento. Dados expressos em média. ( $n=14, 21, 13$  e  $15$  respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.



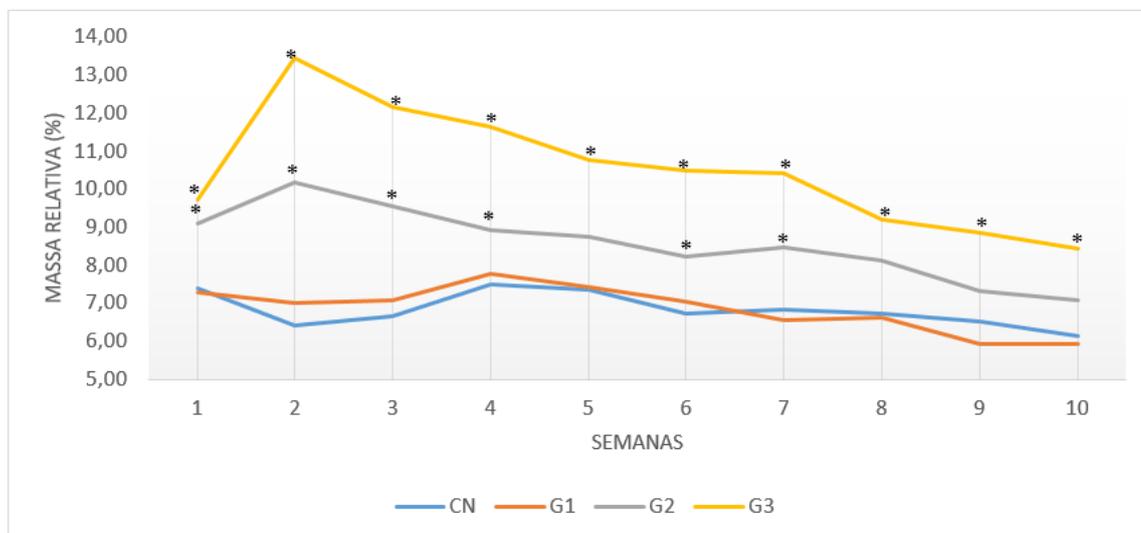
A Figura 14 mostra o consumo relativo de água (%) das fêmeas durante o período de gestação (21 dias) (A) e lactação (21 dias) (B), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos dois períodos ( $P > 0,05$ ).

Figura 14 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de água de fêmeas tratadas com Água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período de gestação (A) e lactação B. Dados expressos em média. ( $n=14, 21, 13$  e  $15$  respectivamente). ANOVA de medidas repetidas.



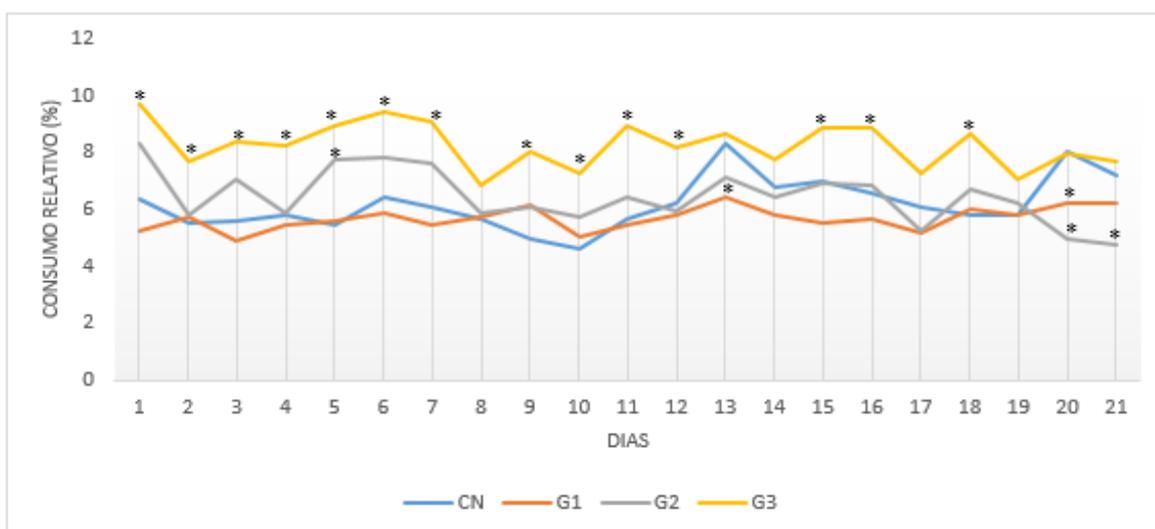
A Figura 15 mostra o consumo relativo de água (%) dos machos, durante o período pré-acasalamento (70 dias). O G1 não apresentou diferença estatisticamente significativa do CN. O G2 diferiu estatisticamente do CN nas semanas 1 a 4, 6 e 7 ( $P<0,01$ ), enquanto que o G3 diferiu estatisticamente do CN durante as 10 semanas de tratamento (1 a 10) ( $P<0,01$ ), em todos os momentos o G2 e G3 apresentaram consumo de água maior que o grupo controle.

Figura 15 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de água de machos tratados com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período pré-acasalamento. Dados expressos em média. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.



A Figura 16 mostra o consumo relativo de ração (%) dos machos, durante o período acasalamento (21 dias). O G1 diferiu estatisticamente do CN nos dias 13 e 20 ( $P<0,05$ ) apresentando menor consumo nesses dias. O G2 diferiu estatisticamente do CN nos dias 5, 20 e 21 ( $P<0,01$ ) e o G3 diferiu estatisticamente do CN nos dias 1 a 7, 9 a 12, 15, 16 e 18 ( $P<0,01$ ), sendo as médias do G3 maiores que as do CN.

Figura 16 – Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de água de machos tratados com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), durante o período pré-acasalamento. Dados expressos em média. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente). ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni.



### 5.4 Peso relativo dos órgãos

A Tabela 2 mostra os pesos relativos dos órgãos das fêmeas, podendo-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa de nenhum órgão em relação ao CN ( $P > 0,05$ ).

Tabela 2 – Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas adultas tratadas por via oral com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), nos períodos pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Dados expressos em média  $\pm$  EPM ( $n=14, 21, 13$  e  $15$  respectivamente).

Peso relativo %	Grupos			
	CN	G1	G2	G3
Coração	0,38 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,01
Baço	0,24 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01
Fígado	5,83 $\pm$ 0,13	5,77 $\pm$ 0,13	6,26 $\pm$ 0,15	5,87 $\pm$ 0,24
Rim direito	0,42 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,01
Rim esquerdo	0,43 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,02
Útero e ovários	0,20 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,004

ANOVA seguida de teste de teste de Bonferroni.

A Tabela 3 demonstra os pesos relativos dos órgão de machos, observando-se que o fígado de todos os grupos tratados com oleuropeína diferiram estatisticamente, apresentando pesos maiores que o grupo controle ( $P < 0,01$ ), nos demais órgãos não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

Tabela 3 – Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos adultos tratados por via oral com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), nos períodos de pré-acasalamento e acasalamento. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. ( $n=8, 7, 9$  e  $7$  respectivamente).

Peso relativo %	Grupos			
	CN	G1	G2	G3
Coração	0,26 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,003	0,27 $\pm$ 0,01
Baço	0,18 $\pm$ 0,007	0,20 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,005	0,21 $\pm$ 0,02
Fígado	3,31 $\pm$ 0,10	3,92 $\pm$ 0,11*	3,89 $\pm$ 0,09*	4,29 $\pm$ 0,16*
Rim direito	0,37 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,004	0,36 $\pm$ 0,009	0,39 $\pm$ 0,01
Rim esquerdo	0,33 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,007	0,35 $\pm$ 0,008	0,37 $\pm$ 0,01
Testículo direito	0,37 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,01
Testículo esquerdo	0,38 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,03
Epidídimo direito	0,12 $\pm$ 0,005	0,12 $\pm$ 0,004	0,14 $\pm$ 0,004	0,15 $\pm$ 0,004
Epidídimo esquerdo	0,13 $\pm$ 0,003	0,12 $\pm$ 0,003	0,14 $\pm$ 0,005	0,14 $\pm$ 0,003
Próstata	0,12 $\pm$ 0,005	0,11 $\pm$ 0,06	0,11 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,009
Vesícula seminal	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01

\*Diferença significativa ( $P < 0,01$ ), em relação ao grupo controle (CN) no teste de ANOVA seguida de teste de Bonferroni.

### 5.5 Parâmetros reprodutivos

A Tabela 4 mostra o desempenho reprodutivo das fêmeas, ao serem tratadas com oleuropeína em três concentrações (G1, G2 e G3) e do grupo controle negativo (CN) que recebeu apenas o veículo (água destilada). Deve-se notar, que para os cálculos da taxa de viabilidade e taxa de desmame, o número de filhotes nascidos vivos utilizado foi o número obtido após a padronização das ninhadas que ocorreu no dia do nascimento, mantendo-se oito filhotes por ninhada. Observa-se diferença estatística, com taxas maiores de gestação ( $P<0,05$ ) e natalidade ( $P<0,01$ ) do G2 quando comparado ao CN, todavia os grupos G2 e G3 apresentam pesos estatisticamente menores dos seus filhotes ao nascer.

Tabela 4 – Taxas reprodutivas das fêmeas adultas tratadas por via oral com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), nos períodos pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. (n=14, 21, 13 e 15 respectivamente).

Desempenho reprodutivo	Grupos			
	CN	G1	G2	G3
Número de filhotes por ninhada	10,86 $\pm$ 0,68	11,30 $\pm$ 0,42	11,19 $\pm$ 0,55	10,92 $\pm$ 0,68
Peso filhotes ao nascer	7,20 $\pm$ 0,05	7,18 $\pm$ 0,04	6,90 $\pm$ 0,05*	6,52 $\pm$ 0,07*
Taxa de acasalamento (%)	95,83	90,48	82,76	88,89
Taxa de gestação (%)	65,22	73,68	95,83**	81,25
Taxa de parto (%)	100	100	100	100
Taxa de perda pós-implantação (%)	9,55	6,62	7,98	10,89
Taxa de natalidade (%)	97,54	98,73	100*	100
Taxa de viabilidade (%)	100	100	100	100
Taxa de desmame (%)	100	100	100	100

\*Diferença significativa ( $P<0,01$ ) e \*\* diferença significativa ( $P<0,05$ ), em relação ao grupo controle (CN) no teste de ANOVA seguido do teste de Bonferroni para as taxas e seguido de post hoc de Turkey para peso dos filhotes ao nascer.

A Tabela 5 mostra o desempenho reprodutivo dos machos, ao serem tratados com oleuropeína em três concentrações (G1, G2 e G3) e do grupo controle negativo (CN) que recebeu apenas o veículo (água destilada). Observa-se diferença estatística, com médias maiores, na produção diária de espermatozoides do grupo G2 e G3 em relação ao CN ( $P<0,01$ ).

Tabela 5 – Parâmetros reprodutivos dos machos tratados por via oral com água destilada (CN) e oleuropeína nas doses de 500 mg/kg/dia (G1), 1000 mg/kg/dia (G2) e 2000 mg/kg/dia (G3), nos períodos de pré-acasalamento e acasalamento. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. (n=8, 7, 9 e 7 respectivamente).

	Grupos			
	CN	G1	G2	G3
Produção diária de espermatozoides ( $\times 10^6$ )	67,33 $\pm$ 4,74	62,99 $\pm$ 8,67	275,59 $\pm$ 27,20*	261,94 $\pm$ 47,84*
Número de espermatozoides ( $\times 10^6$ )	2484,28 $\pm$ 301,27	2074,28 $\pm$ 136,31	2835,56 $\pm$ 182,46	2672,85 $\pm$ 256,34
Espermatozoides anormais (%)	9,14 $\pm$ 1,22	9,21 $\pm$ 0,92	5,61 $\pm$ 0,69	8,07 $\pm$ 1,37
Testosterona sérica (ng/ml)	2,54 $\pm$ 1,3	2,26 $\pm$ 0,59	6,47 $\pm$ 1,42	3,47 $\pm$ 0,89

\*Diferença significativa ( $P < 0,01$ ), em relação ao grupo controle (CN). No teste de ANOVA seguida de teste de Bonferroni.

## 5.6 Análise histopatológica

Não foram observadas alterações macroscópicas e histológicas nos órgãos dos machos e fêmeas expostos a oleuropeína durante os períodos experimentais que compreenderam esse estudo.

## 6 DISCUSSÃO

A oleuropeína é um composto fenólico encontrado em grandes concentrações na *Olea europaea* L., sendo considerada um dos grandes responsáveis pelas diversas atividades biológicas atribuídas à planta (OMAR, 2010). A concentração de oleuropeína no composto utilizado nesse estudo era de 40%, enquanto que a concentração nas folhas secas de *Olea europaea* L. gira em torno de 5 a 9% (HMPC, 2011). Dentre as diversas propriedades terapêuticas atribuídas a esse composto fenólico, pode-se destacar sua atividade antioxidante (JEMAI, 2008, OMAR, 2010), bem como sua ação contra uma série de microrganismos, propriedade essa que vem ganhando grande atenção da comunidade científica (FURNERI, 2002; TASSOU; NYCHAS; BOARD, 1994; TASSOU; NYCHAS 1994 e 1995; TRANTER, 1993; SUDJANA *et al.*, 2009), incluindo o nosso grupo de pesquisas, que com o objetivo de encontrar novas substâncias antifúngicas à partir de compostos naturais, já vem desenvolvendo estudos específicos usando a *Olea europaea* contra fungos filamentosos e leveduriformes (RIPOLL, 2019).

Tendo em vista a ampla gama de estudos envolvendo a oleuropeína, é necessária que a sua segurança toxicológica seja bem estabelecida, afim de tornar seu uso terapêuticos viável. Na literatura é possível encontrar alguns estudos avaliando o potencial de toxicidade de extratos de folhas da *Olea europaea*, porém estudos específicos em relação a oleuropeína são escassos (HASHMI *et al.*, 2015a; OMAR, 2010; PINHEIRO; MELLO, 2012; TÜRKEZ; TOĞAR, 2011). Durante todo o período experimental não foram observadas mortes, apatia, alterações comportamentais, piloereção, prostração, alterações gastrointestinais e convulsões, concordando com o estudos realizados anteriormente (CHRISTIAN *et al.*, 2004; CLEWELL *et al.*, 2016).

### 6.1 Parâmetros reprodutivos

Nossos resultados não demonstraram prejuízos nos parâmetros reprodutivos avaliados. De modo contrário, nos machos ocorreu aumento significativo na produção diária de espermatozoides nos grupos tratados com 1000mg/kg/dia (G2) e 2000mg/kg/dia (G3) de oleuropeína, além de maiores dosagens de testosterona e menor número de espermatozoides anormais no G2, embora esses últimos resultados não tenham se mostrado estatisticamente significativos (Tabela 5). Nas fêmeas, além de nenhum grupo tratado ter apresentado redução das taxas reprodutivas quando comparado ao CN,

ocorram elevação nas taxas de gestação e natalidade do G2. Resultados que não se apresentaram de maneira dose-dependente, uma vez que não se mantiveram no G3.

Estudos prévios, apontam efeitos positivos da oleuropeína sobre o sistema reprodutivo masculino frente a diferentes agressões (ALIREZAEI *et al.*, 2012; ASHKANANI *et al.*, 2020; HAKEMI *et al.*, 2019; ROSTAMZADEH *et al.*, 2020; SARBISHEGI; ALHAGH CHARKHAT GORGICH; KHAJAVI, 2017; SOLIMAN *et al.*, 2019). O estudo conduzido por Alirezai *et al.*, (2012), demonstrou que a oleuropeína foi capaz de reverter danos oxidativos causados pelo etanol sobre espermatozoides de ratos através da inibição do processo de peroxidação lipídica e supressão do estresse oxidativo, evidenciando aumento da motilidade e maior integridade da membrana espermática nos animais que receberam oleuropeína após o etanol, todavia nesse estudo não foi avaliado a ação da oleuropeína sobre as células espermáticas sem o uso concomitante do etanol. Um estudo mais recente, demonstrou a capacidade da oleuropeína de amenizar efeitos deletérios do mancozeb, um fungicida agrícola, sobre a viabilidade e motilidade espermática de ratos, bem como reverter diminuições nas dosagens de testosterona e auxiliar na manutenção da integridade da cromatina dos espermatozoides dos animais que receberam o fungicida. Além disso, no grupo que recebeu apenas oleuropeína na dose de 200mg/kg, sem o mancozeb, foi evidenciado, maior motilidade espermática, aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos e aumento do epitélio germinativo, quando comparados aos demais grupos, incluindo o controle. Esses efeitos benéficos não se mantiveram nas doses de 400mg/kg, não demonstrando uma relação dose-dependente, assim como no nosso estudo (ASHKANANI *et al.*, 2020). Todavia, mais estudos são necessários, especialmente no que diz respeito a doses adequadas e na elucidação de mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos citoprotetores da oleuropeína (ROSTAMZADEH *et al.*, 2020). Esses resultados, fazem da oleuropeína uma substância promissora na mitigação de danos causados as células reprodutivas frente a eventos agressores, ou ainda no tratamento da infertilidade masculina. Nossos resultados, corroboram com esses estudos, ao mostrar uma ação benéfica da oleuropeína sobre a fertilidade, quando administrada em machos adultos, embora em nosso estudo não tenham sido analisados parâmetros como motilidade espermática e nem testes analisando a integridade dos espermatozoides, podendo ser tema de estudos futuros.

## 6.2 Peso de órgãos

A avaliação do peso relativo dos órgãos mostrou aumento do fígado dos machos nos três grupos tratados quando comparados ao grupo controle (Tabela 2), todavia não foram observadas alterações na histopatologia dos órgãos, resultado similar ao demonstrado por Clewell *et al.*, 2016, mas que diferem dos estudos de Arantes-Rodrigues *et al.*, (2011) e Omer *et al.*, (2012), onde ao administrar extrato de folhas de oliva por 14 e 6 semanas respectivamente, evidenciaram além do aumento hepático, alterações hepatocelulares, como hiperplasia de ductos, fibrose e infiltração inflamatória, e elevação de enzimas hepáticas (ALT, fosfatase alcalina e bilirrubinas totais). Essa divergência nos estudos, pode estar relacionada a diferença da composição dos extratos utilizada nos experimentos. Além disso um estudo de 2015, mostrou que a oleuropeína foi capaz de reverter sinais de hepatotoxicidade em animais com toxicidade induzida por bisfenol-A, como degeneração de hepatócitos, proliferação de células de Kupffer e infiltração inflamatória. Efeitos atribuídos a redução do estresse oxidativo nos animais, através da redução de marcadores de peroxidação lipídica e aumento na atividade de catalases hepáticas (MAHMOUDI *et al.*, 2015). Em estudos toxicológicos o fígado tem grande importância, por se tratar do principal responsável pelo metabolismo, tanto de substâncias exógenas como endógenas e por isso também é algo primário da ação tóxica de xenobióticos ou seus metabólitos (SZACHOWICZ-PETELSA *et al.*, 2012). Nossos resultados podem sugerir que a oleuropeína tenha causado algum tipo de agressão hepática aos animais, porém é possível que essa agressão tenha sido reparada devido à sua atividade hepatoprotetora, como citado por Mahmoudi *et al.*, 2015. A dosagem de enzimas hepáticas e análise de marcadores de estresse oxidativo nos nossos animais ao longo do experimento poderiam confirmar essa possibilidade, porém tais ensaios não foram realizados.

## 6.3 Consumo de água

Os machos do G3, consumiram maior quantidade de água em todo o período experimental quando comparado ao CN (Figuras 16 e 17), bem como as fêmeas do G3 consumiram mais água no período pré-acasalamento. Resultados similares foram encontrados na avaliação toxicológica do *Rosmarinus officinalis* (SANTOS, 2007). Porém em estudos de desenvolvimento e toxicidade reprodutiva, o fator de importância é a diminuição da ingestão, pois pode acarretar em prejuízo no desenvolvimento dos animais (LEICHTER & LEE, 1984; CAMPBELL *et al.*; 2009). Além disso, a avaliação dos dados

relativos de consumo de água em estudos de toxicidade e desenvolvimento não podem ser baseados em parâmetros não testados, tais alterações devem ser avaliadas em associação aos dados de hidratação e depleção de fluidos dos animais (CAMPBELL *et al.*, 2009), dados que não foram avaliados nesse experimento.

#### **6.4 Consumo alimentar e desenvolvimento ponderal**

Nesse estudo foi demonstrado que os três grupos tratados com oleuropeína, tanto machos como fêmeas, apresentaram oscilações no consumo de alimento ao longo dos períodos experimentais, sendo mais evidentes em alguns momentos, apesar disso, todos os grupos tiveram aumento de peso ao longo do experimento. Diminuições de ingestão de alimento, água e conseqüentemente diminuição do peso corporal são parâmetros importantes a serem analisados durante a avaliação toxicológica de uma substância, podendo indicar sinais de toxicidade sistêmica ao fornecerem parâmetros do estado de saúde geral dos animais (VALADARES, 2006).

As fêmeas do grupo que recebeu 2000 mg/kg/dia de oleuropeína (G3) consumiram menos alimento do 1º ao 5º dia do período pré-acasalamento e também ganharam menos peso nesse período quando comparadas ao CN, e após isso, as oscilações no consumo não afetaram o ganho de peso corporal. De maneira similar os machos do G3 consumiram menos alimento em relação ao CN na 1ª e 2ª semana do período pré-acasalamento e ganham menos peso da 1ª a 4ª semana, após isso tiveram ganho de peso significativamente superior ao CN na maior parte do experimento (Figuras 12 e 13). Esses resultados diferem de estudos prévios (CHRISTIAN *et al.*, 2004; CLEWELL *et al.*, 2016), e diferem também de outros estudos com substâncias como o glifosato ou *Rosmarinus officinalis* (alecrim), onde não houveram alterações de consumo e no ganho de peso, embora sinais de toxicidade sistêmica tenham sido observados nos animais (DALLEGRAVE, 2003; SANTOS, 2007). A diminuição no consumo alimentar pode ser um indicativo de toxicidade sistêmica, todavia essa diminuição não se manteve ao longo do tempo, sugerindo uma possível adaptação dos animais, além disso, nas doses de 500mg/kg e 1000 mg/kg essa redução não foi evidenciada, tornando essas doses mais seguras para uso.

## 6.5 Toxicidade materna

Durante o período gestacional, as fêmeas do G3 tiveram ganho de peso estatisticamente menor em alguns momentos, especialmente nos 3 últimos dias pré-parto (Figura 5), embora tenham apresentado consumo de alimento estatisticamente similar ao CN. Reduções do peso materno pode indicar sinais de toxicidade materna, quando relacionado a um menor peso dos fetos, especialmente no último trimestre de gestação, quando o peso dos filhotes influencia no peso da progenitora (BEYER *et al.*, 2011). Ao analisarmos o peso da progênie (Tabela 4) nota-se que G3 apresentou também menor peso das ninhadas ao nascer quando comparados ao CN. Ninhadas mais leves também foram observadas no G2, apesar dessas fêmeas não terem apresentado diminuições no ganho de peso durante a gestação e terem apresentado a maior taxa de natalidade. Ao se avaliar a toxicidade materna, no que se refere a ganho de peso diminuído ou perda de peso corporal, deve-se considerar que qualquer efeito que leve a diminuição do peso fetal ou na redução do tamanho da ninhada afetarão o peso materno. De modo que para avaliar a influência do peso corporal fetal sobre o peso materno, é essencial correlacionar que se avalie a correlação entre o peso materno, peso do útero gravídico, tamanho da ninhada e peso dos fetos (BEYER *et al.*, 2011). Nesse estudo, o peso do útero e o número de filhotes por ninhada dos grupos tratados, não demonstraram diferença estatística em comparação ao grupo controle, todavia a redução do peso materno e de suas ninhadas podem indicar sinais de toxicidade materna, corroborando com os achados do segmento II do estudo sobre a toxicidade da oleuropeína (teratogenicidade), onde também ocorreu diminuição do peso das fêmeas do grupo que recebeu 2000mg/kg/dia de oleuropeína no último trimestre de gestação e menor peso das suas ninhadas, além da progênie de todos os grupos tratados ter apresentado retardo no desenvolvimento ósseo (SEBERINO, 2020). Enquanto que no segmento III, a exposição da progênie durante o período gestacional à oleuropeína levou a prejuízos no desenvolvimento físico dos animais, alterações cognitivas e comportamentais, e prejuízo nos parâmetros reprodutivos nos machos púberes devido ao aumento em espermatozoides anormais (OLIVEIRA, 2021). Desse modo, os dados dos três segmentos em conjunto sugerem cautela no uso da oleuropeína durante o período gestacional, sendo mais estudos necessários afim de identificar os mecanismos que levam a essas alterações.

## 7 CONCLUSÃO

A exposição de ratos Wistar machos e fêmeas adultos à oleuropeína no segmento I, nas doses de 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg por dia, durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação para a avaliação da toxicidade crônica e reprodutiva, nos permite concluir que:

- Não foram observados prejuízos nos parâmetros reprodutivos avaliados. De modo contrário, nos machos ocorreu aumento significativo na produção diária de espermatozoides nos grupos G2 e G3, além de maiores dosagens de testosterona e menor número de espermatozoides anormais no G2. Nas fêmeas, além de nenhum grupo tratado ter apresentado redução das taxas reprodutivas quando comparado ao CN, ocorreram elevação nas taxas de gestação e natalidade do G2.
- Houve aumento do peso relativo do fígado dos três grupos tratados com oleuropeína quando comparados ao grupo controle, porém não foram observadas alterações histopatológicas no fígado ou em qualquer outro órgão avaliado, sugerindo uma reversão dos danos hepáticos que possam ter acontecido;
- Durante o experimento ocorreram oscilações nos consumos de água e alimento nos três grupos experimentais, sendo mais evidente o menor consumo alimentar com consequente redução de peso dos machos e fêmeas do G3 no início do período pré-acasalamento, diminuições que não se mantiveram ao longo do tempo, bem como não ocorreram outras alterações sistêmicas como piloereção, tremores e convulsões, sugerindo uma adaptação por parte dos animais;
- As fêmeas de G2 e G3 tiveram ninhadas mais leves quando comparadas ao CN, sendo que as fêmeas de G3 também tiveram menor ganho de peso durante a gestação, especialmente nos últimos dias pré-parto, sinais que sugerem toxicidade materna. Todavia se observou que as fêmeas de G2 além de não terem apresentado redução do peso durante a gestação.

Esse estudo representa o segmento I, de um estudo mais amplo sobre a toxicidade da oleuropeína, compreendido por três segmentos, que teve como objetivo atestar a sua segurança toxicológica para uso *in vivo*. Nossos resultados fazem da oleuropeína uma substância promissora devido a sua ação sobre parâmetros de fertilidade masculina, todavia sugere-se cautela no seu uso o período gestacional, especialmente em altas doses.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABKHOO, J.; JAHANI, S. Efficacy of Some Medicinal Plants Extracts for Potential Antifungal Activity. *International Journal of Infection*, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 2016–2018, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.17795/iji-41156>.
- AL-AZZAWIE, Hasan Fayadh; ALHAMDANI, Mohamed-Saiel Saeed. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life sciences*, v. 78, n. 12, p. 1371-1377, 2006.
- ALIREZAEI, M. et al. Oleuropein protects against ethanol-induced oxidative stress and modulates sperm quality in the rat testis. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 205–211, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12349-011-0079-2>.
- ANDREADOU, Ioanna et al. The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *The journal of nutrition*, v. 136, n. 8, p. 2213-2219, 2006.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia Para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos. RESOLUÇÃO - RE Nº 90, DE 16 DE MARÇO DE 2004.
- ARANTES-RODRIGUES, R. et al. High doses of olive leaf extract induce liver changes in mice. *Food and Chemical Toxicology*, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 1989–1997, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.010>.
- ARIF, Tasleem et al. Natural products–antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian natural products research*, v. 11, n. 7, p. 621-638, 2009.
- ASHKANANI, M. et al. Study on the protective effect of hydroalcoholic Olive Leaf extract (oleuropein) on the testis and sperm parameters in adult male NMRI mice exposed to Mancozeb. *Gene Reports*, [s. l.], v. 21, n. September, p. 100870, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100870>.
- BEYER, B. K. et al. ILSI/HESI maternal toxicity workshop summary: Maternal toxicity and its impact on study design and data interpretation. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 36–51, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bdrb.20281>.
- BOURQUELOT, E.; VINTILESCO, J. C. R. Sur l'oleuropein, nouveau principe de nature glucosidique reuré de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci*, v. 147, p. 533-535, 1908.
- BRASIL. Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm). Acesso em: 20 de fevereiro de 2021).
- BRASIL, 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília. 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Portaria 48, de 16 de março de 2004. Diário Oficial da União, 18.03.2004.

BRASIL. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm) (Acesso em: 20 de fevereiro de 2021).

BULOTTA, S. et al. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: Focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine*, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0219-9>.

CAMPBELL, M.A.; GOLUB, M.S.; IYER, P.; KAUFMAN, F.L.; LI, L.; MESSEN, F.M.; MORGAN, J.E.; DONALD, J.M. Reduced water intake: implications for rodent developmental and reproductive toxicity studies. *Birth Defects Research (Part B)*. v.86, p. 157- 175, 2009.

CAMPESATO, Viviane Ribeiro. *Uso de plantas medicinais durante a gravidez e risco para malformações congênitas*. 2005.

CÁRDENO, Ana et al. Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 $\alpha$ . *Nutrition and cancer*, v. 65, n. 1, p. 147-156, 2013.

CARLUCCIO, Maria Annunziata et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 23, n. 4, p. 622-629, 2003.

CASTEJÓN, M. L. et al. Potential protective role exerted by secoiridoids from *olea europaea* l. In cancer, cardiovascular, neurodegenerative, aging-related, and immunoinflammatory diseases. *Antioxidants*, [s. l.], v. 9, n. 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox9020149>.

CENTRE D'INITIATIVE POUR LA PRODUCTION PROPRE - CIPPP. 2000. *Prévention de la pollution dans la production d'huile d'olive*. Ministère de l'Environnement, Gouvernement Autonome de la Catalogne. Barcelona. Disponível em: <[http://www.cema-sa.org/files/mcsd/fr/oli\\_fr.pdf](http://www.cema-sa.org/files/mcsd/fr/oli_fr.pdf)>. Acesso em: 20 janeiro 2021.

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

CHRISTIAN, M. S. et al. The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug and Chemical Toxicology*, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 309–330, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/DCT-200039714>.

CICERALE, Sara; LUCAS, Lisa; KEAST, Russell. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International journal of molecular sciences*, v. 11, n. 2, p. 458-479, 2010.

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

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

- CLEWELL, A. E. et al. A Comprehensive Toxicological Safety Assessment of na Extract of *Olea Europaea* L. Leaves (Bonolive™). *International Journal of Toxicology*, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 208–221, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1091581815619764>.
- COLALTO, C. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. *Phytotherapy Research*, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 413–425, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.5977>.
- COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS. Assessment report on *Olea europaea* L., folium. European Medicine Agency, [s. l.], v. 44, n. November, p. 1–6, 2011. Disponível em: <https://doi.org/EMA/HMPC/16635/2009>.
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diretriz brasileira para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA. Brasília: CONCEA, 2016.
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 37 de 15 de fevereiro de 2018. Brasília: CONCEA, 2018.
- COUTINHO, Enilton Fick et al. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). *Embrapa Clima Temperado-Sistema de Produção*, [s. l.], v. 16, p. 125, 2009. Disponível em: [www.cpact.embrapa.br](http://www.cpact.embrapa.br).
- COVAS, María-Isabel et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of internal medicine*, v. 145, n. 5, p. 333-341, 2006.
- DANTAS, A. S. Estudo de toxicidade reprodutiva e genotoxicidade do óleo essencial de *Origanum majorana*. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- DE BOCK, Martin et al. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PloS one*, v. 8, n. 3, p. e57622, 2013.
- DE LA PUERTA, Rocío et al. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrergic neurotransmission. *Life Sciences*, v. 69, n. 10, p. 1213-1222, 2001.
- DALLEGRAVE, E. Toxicidade reprodutiva do herbicida Glifosato-Roundup® em ratos Wistar. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- FARAG, R. S.; EL-BAROTY, G. S.; BASUNY, Amany M. Safety evaluation of olive phenolic compounds as natural antioxidants. *International journal of food sciences and nutrition*, v. 54, n. 3, p. 159-174, 2003.
- EBISUI, L.; FONTES, R.S.; LAPCHIK, V.B.V. Rato. In: *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. (orgs). São Paulo: Ed. Atheneu. p. 229 – 250, 2009.
- FANTONI, D.T; CORTOPASSI, S.R.G.; BERNARDI, M.M. Anestésicos Intravenosos e Outros Parenterais. In: SPINOSA, H.S. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

- FDA - Food and Drug Administration. Guideline for Industry. Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products. 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm074950.pdf> (Acesso em: 20 de fevereiro de 2021).
- FURNERI, Pio Maria et al. In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International journal of antimicrobial agents*, v. 20, n. 4, p. 293-296, 2002.
- FÜRST, R.; ZÜNDORF, I. Evidence-Based Phytotherapy in Europe: Where Do We Stand? *Planta Medica*, [s. l.], v. 81, n. 12–13, p. 962–967, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545948>.
- FREDRICKSON, William R. Method and composition for antiviral therapy. U.S. Patent n. 6,117,844, 12 set. 2000.
- HAKEMI, S. G. et al. The effects of olive leaf extract on the testis, sperm quality and testicular germ cell apoptosis in male rats exposed to busulfan. *International Journal of Fertility and Sterility*, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 57–65, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5520>.
- HAMDI, H. K.; CASTELLON, Raquel. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [s. l.], v. 334, n. 3, p. 769–778, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.161>.
- HASHMI, M. A. et al. Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europaea* (olive). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, [s. l.], v. 2015, 2015a. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/541591>.
- HASSEN, I.; CASABIANCA, H.; HOSNI, K. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation - A mini-review. *Journal of Functional Foods*, [s. l.], v. 18, n. 2015, p. 926–940, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.001>.
- HOLLENBACH, C. B.; BING, R. S.; STEDILE, R.; MELLO, F. P. S.; SCHUCH, T. L.; RODRIGUES, M. R. A.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. Reproductive Toxicity Assessment of *Origanum vulgare* Essential Oil on Male Wistar Rats. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 43, p. 1-7, jun. 2015.
- HOLLENBACH, C. B. Estudo da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em ratos Wistar. 2013. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- HERRERO-ENCINAS, J. et al. Effects of a bioactive olive pomace extract from *Olea europaea* on growth performance, gut function, and intestinal microbiota in broiler chickens. *Poultry Science*, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 2–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps/pez467>.
- HUANG, Christina L.; SUMPIO, Bauer E. Olive oil, the mediterranean diet, and cardiovascular health. *Journal of the American College of Surgeons*, v. 207, n. 3, p. 407-416, 2008.
- IVANOV, M. et al. Highly potent antioxidant *Olea europaea* l. Leaf extract affects carotid and renal haemodynamics in experimental hypertension: The role of oleuropein. *EXCLI Journal*, [s. l.], v. 17, p. 29–44, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.17179/excli2017-1002>.

- JARDIM, L. H. Avaliação da administração do alcaloide boldine em ratas Wistar durante o período gestacional sobre variáveis reprodutivas e comportamentais. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- JEMAI, Hedy et al. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-biological interactions*, v. 176, n. 2-3, p. 88-98, 2008.
- KAEIDI, A. et al. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: In vitro and in vivo studies. *Journal of Ethnopharmacology*, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 188–196, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.038>.
- KENDALL, M. et al. Zero effect of multiple dosage of olive leaf supplements on urinary biomarkers of oxidative stress in healthy humans. *Nutrition*, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 270–280, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.08.008>.
- KORUKLUOGLU, M. et al. Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea* L.) extracts from the Trilye Region of Turkey. *Annals of Microbiology*, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 359–362, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF03175032>.
- LEICHTER, J.; LEE, M. Does dehydration contribute to retarded fetal growth in rats exposed to alcohol during gestation? *Life Sci.* v. 35, p. 2105–2111, 1984.
- LEMONICA, I. P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M. T. V.; SCHÜLER-FACCINI, L. Manual de teratogênese. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2001.
- LIMAN, R. et al. Antiangiogenic and Apoptotic Effects of Oleuropein on Breast Cancer Cells. *British Journal of Pharmaceutical Research*, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.9734/bjpr/2017/33403>.
- LIPHSCHITZ, Nili et al. The beginning of olive (*Olea europaea*) cultivation in the Old World: a reassessment. *Journal of Archaeological Science*, v. 18, n. 4, p. 441-453, 1991.
- LOMBARDO, M. Potencial Adverso De Medicamentos Fitoterápicos : Um Estudo Com Foco Em Medicamentos De Registro Adverse Potential of Herbal Medicines : a Study With Focus on Products. *Revista Ciência Saúde*, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–11, 2018.
- MA, Shuang-Cheng et al. In vitro evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum* as antiviral agents. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, v. 49, n. 11, p. 1471-1473, 2001.
- MAHMOUDI, A. et al. Oleuropein and hydroxytyrosol protect from bisphenol A effects in livers and kidneys of lactating mother rats and their pups'. *Experimental and Toxicologic Pathology*, [s. l.], v. 67, n. 7–8, p. 413–425, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etp.2015.04.007>.
- MARKIN, D.; DUEK, L.; BERDICEVSKY, I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern in vitro*. *Mycoses*, v. 46, n. 3-4, p. 132-136, 2003.
- MARTINEZ-GONZALEZ, Miguel Angel et al. Mediterranean food pattern and the primary prevention of chronic disease: recent developments. *Nutrition reviews*, v. 67, n. suppl\_1, p. S111-S116, 2009.

- MEDEIROS, Rosalina Marangon Lima et al. Destinação e reaproveitamento de subprodutos da extração olivícola. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 15, n. 2, p. 100-108, 2016.
- MELLO, M.S.C. Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos. 131f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ, 2007.
- MENDES, J. F. et al. Antifungal susceptibility profile of different yeasts isolates from wild animals, cow's milk with subclinical mastitis and hospital environment. *Brazilian Journal of Biology*, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 68–75, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.04916>.
- MICOL, V. et al. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Research*, [s. l.], v. 66, n. 2–3, p. 129–136, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.02.005>.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Brasília, DF: Ed. MS, 2012. Cadernos de Atenção Básica; 31. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas\\_integrativas\\_complementares\\_plantas\\_medicinais\\_cab31.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf). Acesso em 20 de janeiro de 2021.
- MUZZALUPO, I. et al. In vitro Antifungal Activity of Olive (*Olea europaea*) Leaf Extracts Loaded in Chitosan Nanoparticles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, [s. l.], v. 8, n. March, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00151>.
- NASRALLAH, H. et al. Effect of oleuropein on oxidative stress, inflammation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Life Sciences*, [s. l.], v. 255, n. March, p. 117833, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117833>.
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 416, Two Generation Reproduction Toxicity Study, 2001.
- OLIVEIRA, A. C.; ROPKE, C. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Fitos*, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 185–198, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20160015>.
- OLIVEIRA, M. R. F. Avaliação da toxicidade peri e pós-natal (segmento III) da oleuropeína em ratos Wistar. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.
- OMAR, S. H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 133–154, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3797/scipharm.0912-18>.
- OMER, S. A. et al. Toxicity of Olive Leaves (*Olea europaea* L.) in Wistar Rats. [S. l.: s. n.], 2012.
- OSÓRIO, L.G. Avaliação da atividade anti-*Aspergillus* do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. in vivo e in vitro em frangos. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS, 2014.

- OWEN, Robert W. et al. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The lancet oncology*, v. 1, n. 2, p. 107-112, 2000.
- PAN, S. Y. et al. Historical perspective of traditional indigenous medical practices: The current renaissance and conservation of herbal resources. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, [s. l.], v. 2014, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/525340>.
- PANIZZI, L.; SCARPATI, M. L.; ORIENT, G. The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. *Gazz. Chim. Ital*, v. 90, p.1449-85, 1960.
- PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, [s. l.], v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X).
- PINHEIRO, M; MELLO, Ld. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. *Alimentos e Nutrição*, [s. l.], p. 537–548, 2012. Disponível em: <http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/1417>.
- POUDYAL, H.; CAMPBELL, F.; BROWN, L. Olive Leaf Extract Attenuates Cardiac, Hepatic, and Metabolic Changes in High Carbohydrate–, High Fat–Fed Rats. *The Journal of Nutrition*, [s. l.], v. 140, n. 5, p. 946–953, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/jn.109.117812>.
- RIPOLL, M. K. Potencial antifúngico de *Olea europaea* frente a fungos leveduriformes e filamentosos. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.
- ROMAN, S. S.; DAMBROS, A.; ROSSET, A.; PISTORE, M.; SCHIMID, A. R.; CANSIAN, R. L. Toxicidade materna e reprodutiva de extrato hidroalcoólico de *Sonchus oleraceus* L. em ratos Wistar. *Perspectiva*, v.38, p. 69-77, mar., 2014.
- ROSS, M. H.; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. *Histologia Texto e Atlas*. 2.ed. São Paulo: Panamericana, 1989.
- ROSTAMZADEH, A. et al. Comparison effects of olive leaf extract and oleuropein compounds on male reproductive function in cyclophosphamide exposed mice. *Heliyon*, [s. l.], v. 6, n. 4, p. e03785, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03785>.
- SALHI, N. et al. Antifungal Activity of Aqueous Extracts of Some Dominant Algerian Medicinal Plants. *BioMed Research International*, [s. l.], v. 2017, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/7526291>.
- SANTIN, R.; MADRID, I.; MATOS, C.B.; FREITAG, R.; MEIRELES, M. C. A.; CLEFF, M. B.; MELLO, J. R. B. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 66, p. 367-373, 2014.
- SANTOS, L. D. Avaliação da Toxicidade Reprodutiva do Óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis* L. em Ratos Wistar. 2017. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- SARBISHEGI, M.; ALHAGH CHARKHAT GORGICH, Enam; KHAJAVI, Ozra. Olive leaves extract improved sperm quality and antioxidant status in the testis of rat

exposed to rotenone. *Nephro-Urology Monthly*, [s. l.], v. 9, n. 3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5812/numonthly.47127>.

SEBERINO, G. B. avaliação da toxicidade pré-natal: Estudo de teratogenicidade (segmento I) da oleuropeína em ratos Wistar. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

SEBRAE-RS, Maior produtor brasileiro de azeite de oliva expande área no RS. Disponível em: <https://sebraers.com.br/momento-da-empresa/maior-produtor-brasileiro-de-azeite-de-oliva-expande-area-no-rs/#> acesso em 20 de fevereiro de 2021.

Secretaria de Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPA), Pró Oliva. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/pro-oliva>, acesso em 20 de fevereiro de 2021.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. In: ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SOLER-RIVAS, Cristina; ESPÍN, Juan Carlos; WICHERS, Harry J. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, n. 7, p. 1013-1023, 2000.

SOLIMAN, G. A. et al. Olive leaves extract attenuates type II diabetes mellitus-induced testicular damage in rats: Molecular and biochemical study. *Saudi Pharmaceutical Journal*, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 326–340, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.11.015>.

SUDJANA, A. N. et al. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 461–463, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.10.026>.

SZACHOWICZ-PETELSKA, B. et al. Protective effect of blackcurrant on liver cell membrane of rats intoxicated with ethanol. *The Journal of membrane biology*, v. 245, n. 4, p. 191-200, 2012.

TASSOU, C. C.; NYCHAS, G. J.; BOARD, R. G. Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus cereus* T spores. *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 13, n. 2, p. 231-237, 1991.

TASSOU, C. C.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system. *Letters in applied microbiology*, v. 20, n. 2, p. 120-124, 1995.

TASSOU, C. C.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by olive phenolics in broth and in a model food system. *Journal of Food Protection*, v. 57, n. 2, p. 120-124, 1994.

TRANter, H. S.; TASSOU, Soula C.; NYCHAS, G. J. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 74, n. 3, p. 253-259, 1993.

TRIPOLI, E. et al. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 98–112, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/nrr200495>.

TÜRKEZ, H.; TOĞAR, B. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract counteracts genotoxicity and oxidative stress of permethrin in human lymphocytes. *Journal of*

Toxicological Sciences, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 531–537, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2131/jts.36.531>.

U.S. Environmental Protection Agency, USEPA. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. (EPA/630/R-96/009), Washington, Federal Register v. 61, n. 212, p. 56274-56322, 1996.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégia após a “Era do Teste DL50”. Revista Eletrônica de Farmácia. v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VERA, Raúl et al. Feeding dry olive cake modifies subcutaneous fat composition in lambs, noting cake resistance to degradation and peroxidation. Alimentación con alperujo modifica la composición de grasasubcutánea en corderos, con una nota en la resistencia del alperujo a. 2009.

VISIOLI, Francesco; BELLOSTA, Stefano; GALLI, Claudio. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. Life sciences, v. 62, n. 6, p. 541-546, 1998.

VISHWAKARMA, A. P. et al. Magical remedies of Terminalia arjuna (ROXB.). International Journal of Pharmaceutical Archive, v. 2, n. 8, p. 189-201, 2013.

WALLER, S.B. Potencial anti-Sporotrix spp. de plantas da família Lamiaceae. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS, 2015.

WALLER, S. B.; HOFFMANN, J.; MADRID, I.M.; PICOLI, T.; CLEFF, M. B.; CHAVES, F.; ZANETTE, R. A.; MELLO, J. R. B.; FARIA, R.O.; MEIRELES, M. C. A. Polar Origanum vulgare (Lamiaceae) extracts with antifungal potential against Sporothrix brasiliensis. MEDICAL MYCOLOGY. v. 56, p. 225-233, 2017.

WALKER, Christopher; REAMY, Brian V. Diets for cardiovascular disease prevention: what is the evidence? American family physician, v. 79, n. 7, p. 571-578, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Organización Mundial de la Salud Ginebra. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world medicines situation 2011: Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO Press, 2011.

YAO, J. et al. Oleuropein induced apoptosis in HeLa cells via a mitochondrial apoptotic cascade associated with activation of the c-Jun NH2-terminal kinase. Journal of pharmacological sciences, v. 125, n. 3, p. 300-311, 2014.

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

## ANEXO A – Laudo da Comercial da Oleuropeína



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

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

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

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

**Conclusion** Conform with specification

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

**Shelf life** 2 years when properly stored

**Analyst:** Feng QingShuang

**Corrector:** Guo Shasha

Feng Qingshuang

Guo Shasha

## ANEXO B – Análise química da amostra de oleuropeína

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

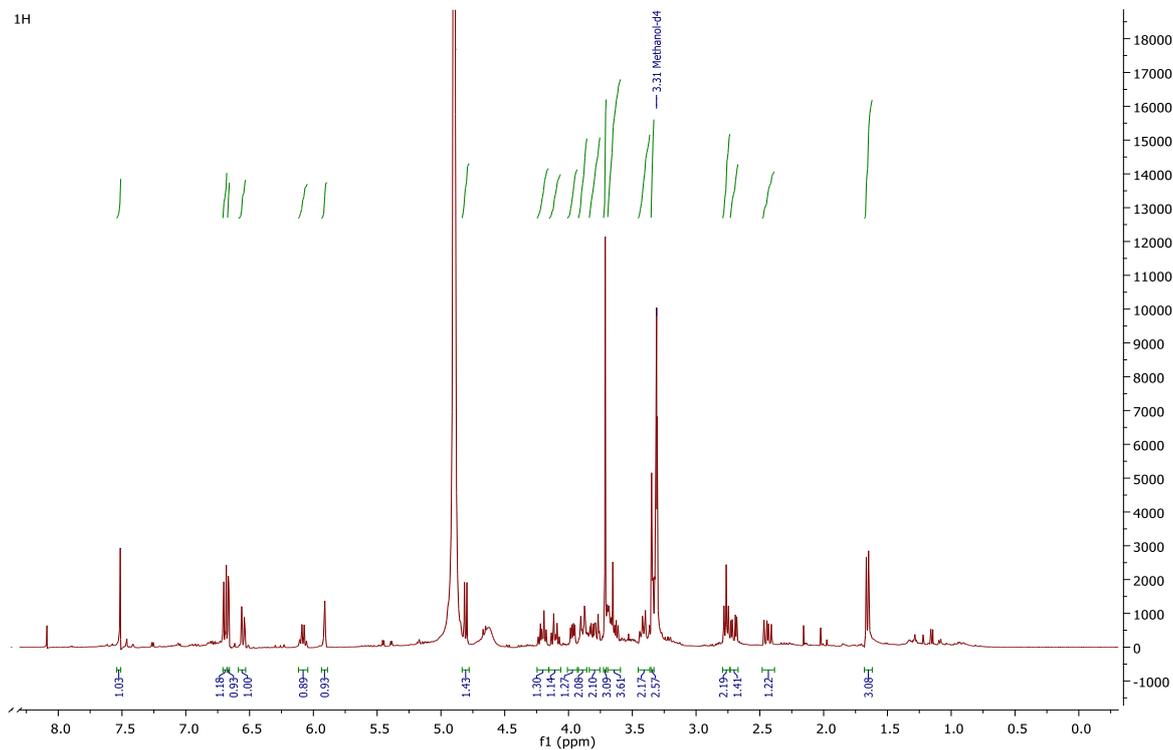
A amostra foi analisada por diferentes ferramentas analíticas, como ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de ultravioleta (UV), (Figura 3 a 8).

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

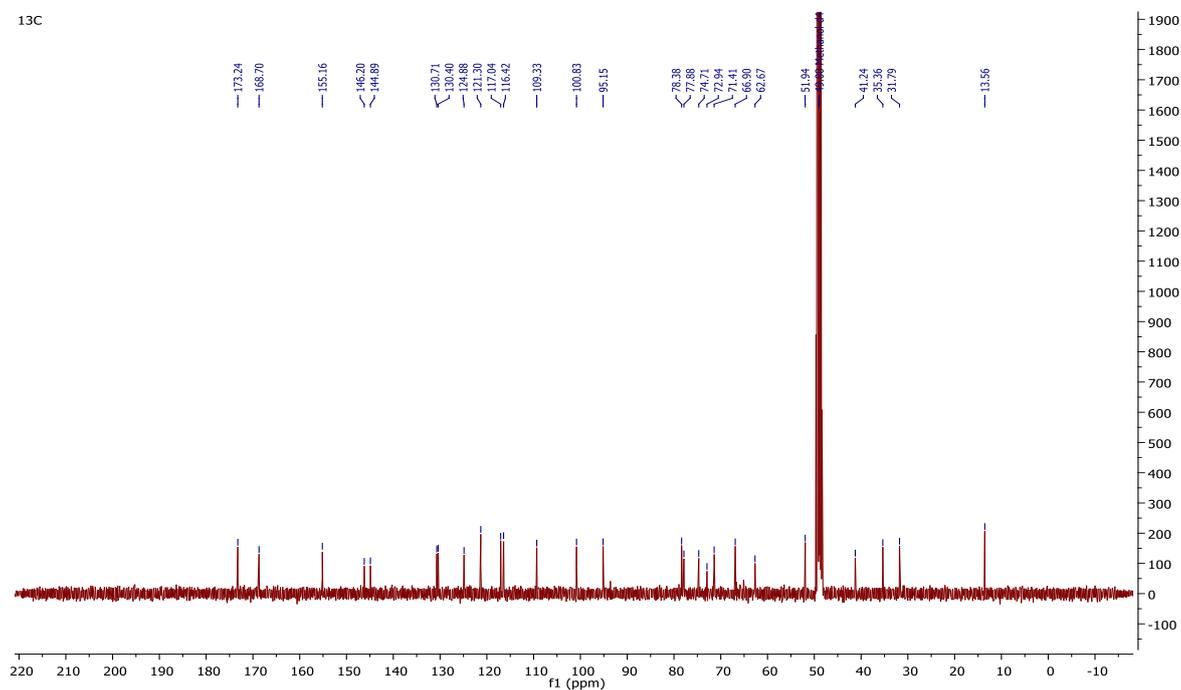
Para a análise de EM, a amostra foi injetada diretamente em um equipamento Q-TOF (micrOTOF-QII Bruker Daltonics) com ionização por eletrospray (ESI). A análise foi realizada no modo negativo, utilizando N<sub>2</sub> a 200°C, fluxo de gás de 8 L/min, voltagem do capilar de 4000 eV e energia de ionização de 3 eV. Foi realizada uma varredura da amostra na faixa de 100 a 1000 *m/z*. O composto oleuropeína presente na amostra foi identificado de acordo com o seu valor de massa exata de alta resolução e com o perfil de fragmentação dos íons. Os espectros de massas obtidos em modo negativo para oleuropeína apresentam semelhança com os obtidos por Barón et al. (2015) e Quirantes-Piné et al. (2013).

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

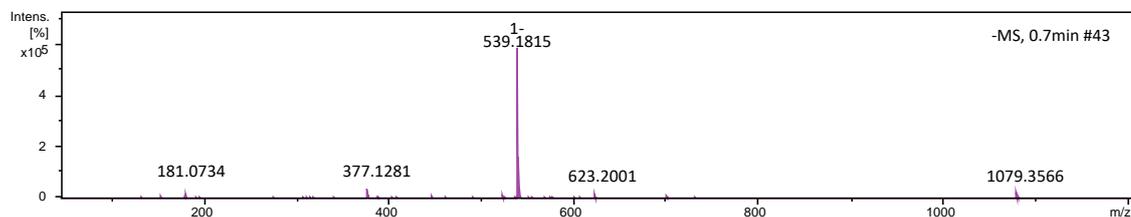
**Figura 3.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da amostra (400 MHz, MeOD). Neste tipo de espectro é possível obter informações a respeito dos átomos de hidrogênio da molécula que estão ligados a átomos de carbono.



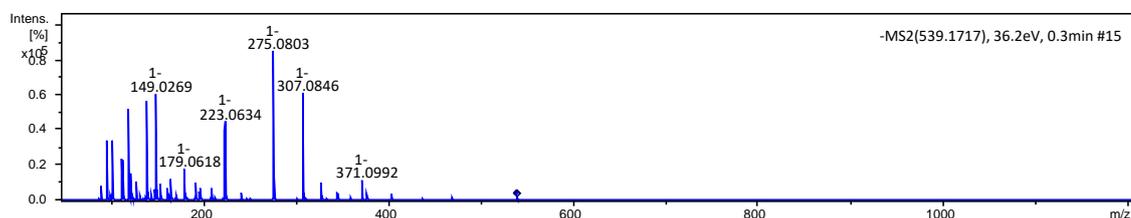
**Figura 4.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da amostra (100 MHz, MeOD). Neste tipo de espectro é possível obter informações a respeito dos átomos de carbono da molécula.



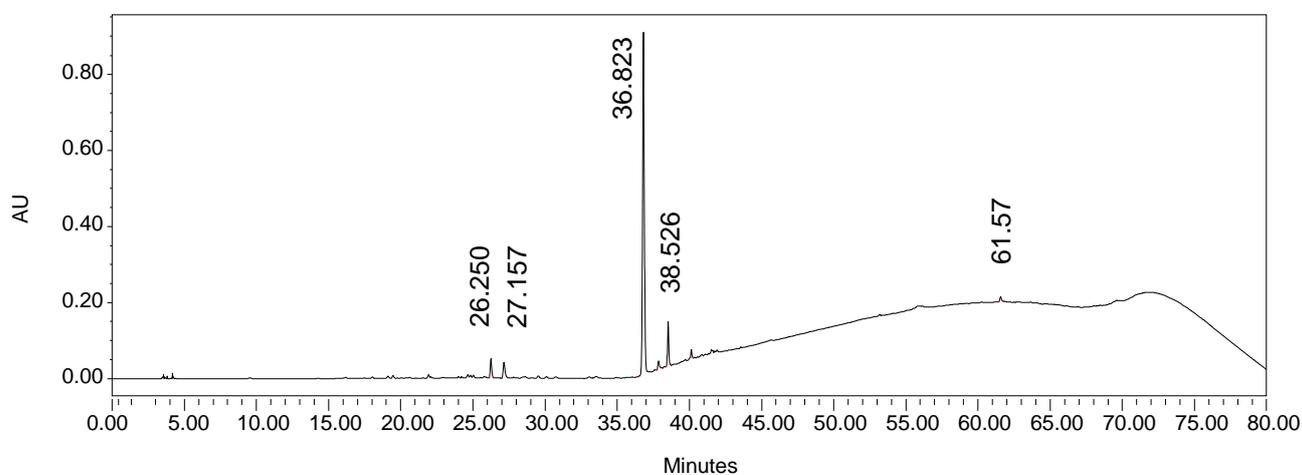
**Figura 5.** Espectro de massas da amostra através de injeção direta por Q-tof-ESI-MS, modo negativo. Neste tipo de espectro é possível obter informação a respeito da massa molecular do composto.



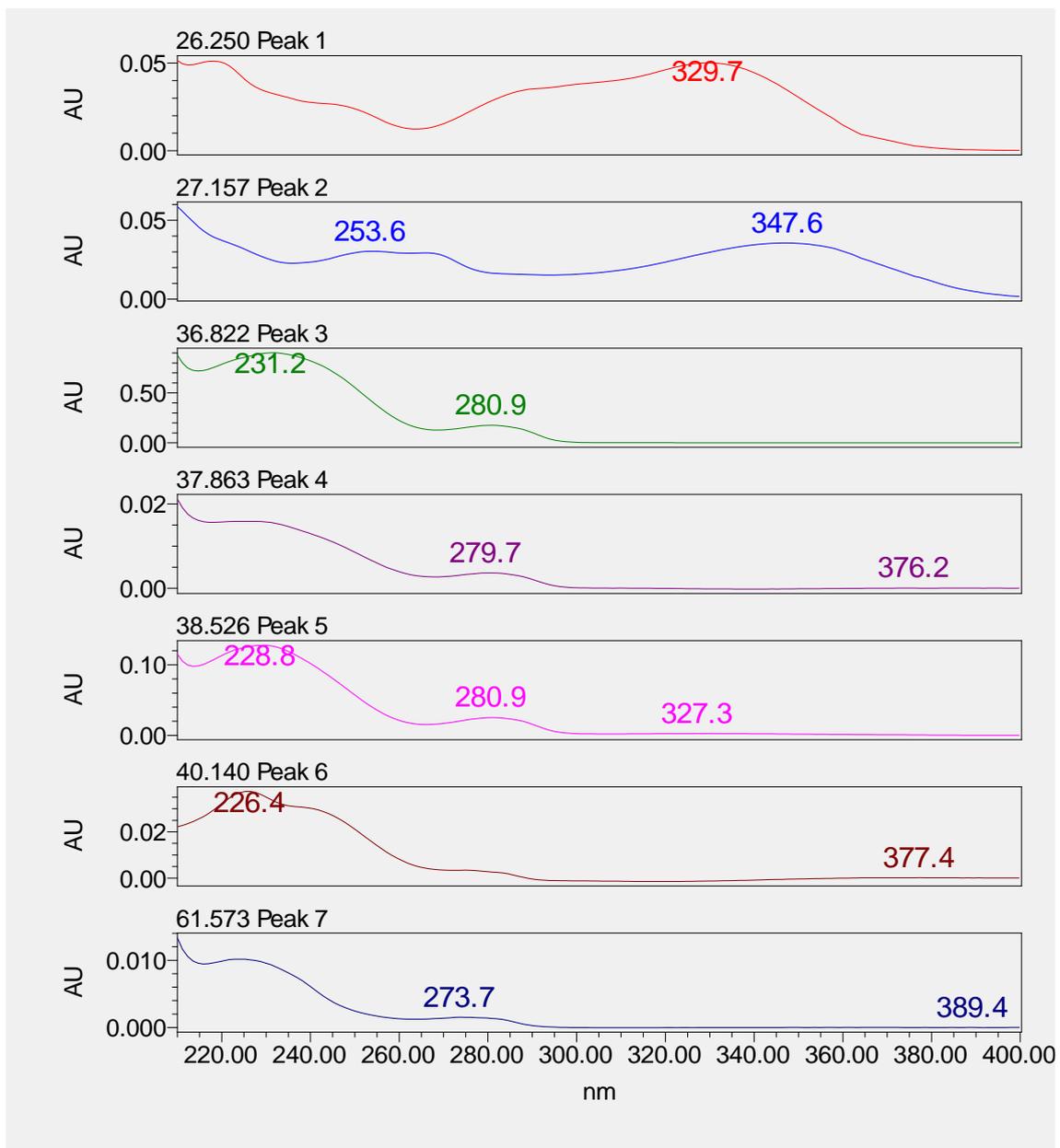
**Figura 6.** Padrão de fragmentação da oleuropeína por Q-tof-ESI-MS, modo negativo. Neste tipo de espectro é possível obter informações a respeito do perfil de fragmentação da amostra analisada.



**Figura 7.** Cromatograma da amostra por CLAE-DAD (210-400 nm). Neste tipo de análise, é possível obter informações do perfil cromatográfico da amostra analisada, observando a presença do composto de interesse (majoritário), assim como de outras substâncias minoritárias.



**Figura 8.** Espectros de UV dos picos observados no cromatograma da amostra por CLAE-DAD (210-400 nm). Em verde, é possível observar o espectro de UV do pico majoritário do cromatograma da Fig. 7.



## ANEXO C – Carta de Aprovação CEUA - UFRGS



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRO-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37279

Título: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA E REPRODUTIVA (Segmento I) do óleo essencial de Olea europaea em Ratos Wistar

Vigência: 07/05/2019 à 28/02/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

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

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 24/06/2019 - Auditório do Plenarinho - Andar Térreo do Prédio da Reitoria - Campus Centro UFRGS - Bairro Farroupilha - Porto Alegre/RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 160 ratos (40 machos e 120 fêmeas) Wistar, com 90 dias de idade provenientes do CREAL da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Sexta-Feira, 12 de Julho de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Coordenador da comissão de ética