

MIRIAN CAMPOS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO REPRODUTIVO DO EXTRATO
DE *Cordia ecalyculata* Vell, EM RATOS *WISTAR***

ASSIS

2014

MIRIAN CAMPOS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO REPRODUTIVO DO EXTRATO
DE *Cordia ecalyculata* Vell, EM RATOS *WISTAR***

Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências e Letras de Assis – UNESP –
Universidade Estadual Paulista para
obtenção do título de Mestre em
Biociências (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da
Diversidade Biológica)

Orientador(a): Dra. Isabel Cristina
Cherici Camargo

ASSIS

2014

Amanda Sertori dos Santos - Bibliotecária - CRB-8 9061
Centro Cultural Matarazzo - Presidente Prudente- SP

S231a Santos, Mirian Campos dos
Avaliação do potencial tóxico reprodutivo do extrato de
Cordia ecalyculata Vell, em ratos Wistar. / Mirian Campos dos
Santos. – Assis, 2014.

76 f. : Il.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências e Letras de
Assis, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2014.

Orientador: Dr^a. Isabel Cristina Cherici Camargo.

1. Biologia. 2. Toxicologia reprodutiva 3. Embriologia. I.
Autor. II. Título.

CDD 571.8

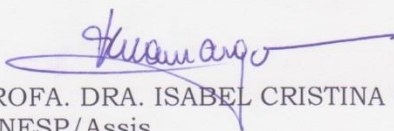
MIRIAM CAMPOS DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO REPRODUTIVO DO
EXTRATO DE *Cordia ecalyculata* Vell, EM RATOS WISTAR

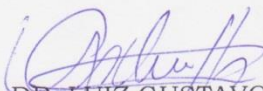
Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências e Letras – UNESP para a
obtenção do título de Mestra em
Biociências (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da
Diversidade Biológica)

Data da Aprovação: 23/07/2014

COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: PROFA. DRA. ISABEL CRISTINA CHERICI CAMARGO -
UNESP/Assis



Membros: PROF. DR. LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA -
UNESP/BotucatuAssis



PROF. DR. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA -
UNESP/Assis

A Deus, aos meus pais, amigos
e professores, indispensáveis à
minha formação, dedico.

SANTOS, Mirian Campos dos. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO REPRODUTIVO DO EXTRATO DE *Cordia ecalyculata* Vell, EM RATOS WISTAR, 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

Resumo

A utilização de extratos de *Cordia ecalyculata* está crescendo devido ao seu potencial em inibir o apetite. Seus efeitos colaterais na reprodução são desconhecidos. Então, o estudo avaliou o potencial tóxico reprodutivo de diferentes doses do extrato de *C. ecalyculata* em ratos adultos. Os animais (n=12/grupo) receberam água destilada (grupo Controle) ou o extrato hidroetanólico de *C. ecalyculata* em diferentes concentrações de 1,5 ml (20, 100 e 400 mg/kg de peso corpóreo). Os tratamentos foram administrados por via oral (gavage), única dose/dia, durante 60 dias consecutivos. Ao final do tratamento, a massa corpórea dos animais que receberam o extrato foi similar ao grupo controle, demonstrando a ineficácia do fitoterápico na redução do peso corporal. O peso dos testículos, vesículas seminais e próstata não foi afetados pelos tratamentos ($p>0,05$), mas houve aumento significativo no peso dos epidídimos na dose de 400 mg/kg do extrato. Em todas as doses, os testículos e epidídimos apresentaram alterações histopatológicas, houve aumento significativo no percentual de gametas anormais na cauda do epidídimo e a taxa de fertilidade dos animais foi reduzida ($p<0,05$). Concluiu-se que o extrato de *Cordia ecalyculata* promoveu toxicidade reprodutiva, porém com ausência de efeito dose-dependente.

Palavras-chave: Toxicidade reprodutiva; porangaba; Pholia Magra®; epidídimos; histopatologia; fertilidade.

SANTOS, Mirian Campos dos. EVALUATION OF REPRODUCTIVE TOXIC POTENTIAL OF EXTRACT *Cordia ecalyculata* Vell, IN WISTAR RATS, 2014. 76 f. Dissertation (Master's degree in Bioscience)- Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

Abstract

The use of extracts from *Cordia ecalyculata* is growing due to their potential to inhibit appetite. Its side effects on reproduction are unknown. Then, the study evaluated the reproductive toxic potential of different doses of the extract of *C. ecalyculata* in adult rats. The animals (n = 12/group) received distilled water (control group) and the hydroethanolic extract of *C. ecalyculata* in different doses (20, 100 and 400 mg / kg body weight). Treatments were administered orally (gavage), single dose/day for 60 consecutive days. At the end of treatment, the body weight of the animals that received the extract was similar to the control group, demonstrating the ineffectiveness of this herbal medicine in reducing body weight. The weight of the testes, seminal glands and prostate were not affected by treatments ($p > 0.05$), but increased there was ($p < 0.05$) on the epididymis weight at a dose of 400 mg / kg of the extract. At all doses, the testes and epididymides showed histopathological changes, increased ($p < 0.05$) the percentage of abnormal gametes in the epididymal tail and fertility of animals was reduced ($p < 0.05$). In conclusion that the extract of *Cordia ecalyculata* promoted reproductive toxicity, but without dose-dependent effect.

Keywords: *Reproductive toxicity*; epididymis; histopathology; testes; Pholia Magra®; fertility.

SUMÁRIO

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
INTRODUÇÃO.....	08
1. Obesidade e Uso de Fármacos.....	09
2. <i>Cordia ecalyculata</i>.	11
3. Plantas medicinais e a Reprodução.....	15
4. Testículos	20
5. Epidídimos	23
OBJETIVOS	25
ARTIGO	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	55
Anexo	70

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Obesidade e o uso de fármacos

Desde a antiguidade, a população busca uma forma de prevenir doenças, tratá-las e amenizar os sintomas, a partir da utilização de plantas medicinais. São variadas as formas como essas plantas são utilizadas, seja em compressas, infusões, decocções, emplastos, entres outros (DALLAQUA et al., 2001; MELLO et al., 2007).

Produtos naturais são utilizados para diversos tratamentos estéticos, assim como para tratamentos de diversas patologias, sendo que muitos são comercializados como emagrecedores. Geralmente, as plantas utilizadas para perda ou manutenção de peso agem como estimulantes do metabolismo ou como moderadores do apetite (TUROLLA, 2004), inclusive no tratamento da obesidade (PELIZZA, 2010).

A obesidade, considerada uma epidemia mundial, afeta crianças e adultos. O sobrepeso é um fator de risco para diabetes não dependente de insulina, doenças cardiovasculares, osteoartrite, alguns tipos de câncer, e certas desordens reprodutivas e metabólicas (MAYES; WATSON, 2004).

Estudos têm mostrado uma relação entre obesidade e infertilidade, mas ainda há controvérsias. pois não foram significativa as diferenças encontradas na contagem de espermatozoides, espermatozoides anômalos, nem alteração nos níveis de testostetorona de pacientes obesos (PAASCH et al., 2010). Estudo realizado em ratos *Wistar* que se alimentaram com dieta de alto teor de gordura demonstrou que houve diminuição na motilidade dos espermatozoides, resultando em redução no potencial de fertilidade após a inseminação artificial

(FERNANDEZ et al., 2011). O aumento de peso, independentemente de outros fatores de risco, traz prejuízos à função sexual como desejo sexual, ereção e ejaculação (DALLAL et al., 2008). A redução do peso corporal seja por meio de procedimentos cirúrgicos ou através da mudança do estilo de vida, dietas e atividade física permite inferir melhora na satisfação sexual de homens obesos (SOUZA et al., 2011).

Apesar do aumento no número de pessoas com excesso de peso e com obesidade, o tratamento clínico inclui apenas alguns tipos de drogas (CATERSON, 1999). Fenfluramina e fluoxetina foram sugeridas como possíveis soluções, mas causam efeitos colaterais, razão pela qual foram retiradas do mercado (CANNISTRA et al., 1997; MARK et al., 1997; ROTHMAN; BAUMAN, 2002). Atualmente é prescrito o uso da sibutramina, com comercialização controlada rigorosamente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e proibida em vários países, devido aos efeitos colaterais que promove em pacientes com problemas cardiovasculares. Este fármaco geralmente promove aumento da pressão arterial, fadiga, constipação, taquicardia, dor de cabeça e insônia (LUQUE & REY, 1999; FANGHANEL *et al.* 2000; JAMES *et al.* 2000).

Devido aos efeitos colaterais que os fármacos sintéticos têm promovido sobre a saúde humana, a utilização de fitoterápicos e outros produtos naturais como alternativa para a terapia antiobesidade tem recebido grande atenção da população (BELLO et al., 2002). Nas últimas décadas houve um aumento no consumo de produtos naturais e uma das justificativas para esse crescimento é a repercussão na mídia, principalmente em revistas e *sites* que abordam o tema emagrecimento (PELIZZA, 2010). Além disso, comumente a população

adere ao pensamento errôneo de que produtos naturais não causam efeitos colaterais (PELIZZA, 2010).

Há ainda poucos estudos relacionados à toxicidade de fitoterápicos e para controle do peso, sendo que suas possíveis propriedades terapêuticas, farmacológicas e toxicológicas têm recentemente recebido maior atenção na comunidade científica. Um exemplo é a *Cordia ecalyculata* Vell, denominado no mercado como Pholia Magra®, que tem sido utilizada por pessoas que buscam a redução ou a manutenção do peso corpóreo, com e sem recomendação clínica (BELLO *et al.* 2002; PELIZZA, 2010).

2. *Cordia ecalyculata*

O gênero *Cordia* foi descrito por Linnaeus em 1753 e pertence à família *Boraginaceae*, a qual conta com cerca de 100 gêneros e 2.000 espécies difundidas nos trópicos, nas regiões temperadas e árticas (LORENZI, 2008).

A *Cordia ecalyculata* Vell, tem por nomenclatura científica alguns sinônimos como: *Cordia digynia* Vell., *Cordia salicifolia* Cham., *Cordia glaziovii* Taub., *Cordia coffeoides* Warm (LORENZI, 2008; PELIZZA, 2010). Popularmente é conhecida como chá-de-bugre, porangaba, cafezinho, café-do-mato, chá-de-frade, louro-salgueiro, café-de-bugre, claraiba, louro-mole e erva anti-barriga. Distribuída desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, tendo sido também encontrada na Argentina e no Paraguai (SAITO *et al.*, 1986), principalmente na floresta semidecídua (LORENZI, 2008). O gênero *Cordia* L. é representado por 26 espécies somente no Estado de São Paulo (CARDOZO *et al.*, 2008).

Na fase adulta, os representantes do gênero *Cordia* podem ter de 8 a 20 m de altura (Figura 1); a copa é alongada e o tronco pode ter de 20 a 40 cm de diâmetro, o tamanho das folhas varia de 8 a 18 cm de comprimento. A planta possui pequeninas flores brancas e seus frutos são bagas globosas avermelhadas semelhantes ao café (LORENZI, 2002).



Figura 1. *Cordia ecalyculata* Vell com destaque para as folhas e frutos (LORENZI, 2002).

Destacam-se em sua composição química a presença de alguns alcaloides como cafeína, alantoína e ácido alantóico, e também glicosídeos como a consolidina, entre outros tipos como taninos, flavonoides, saponinas, mucilagens nos extratos fluidos desta planta, pigmentos e na parte de compostos inorgânicos, o potássio (ASSONUMA, 2009; SAITO, 1986).

Em várias partes do país suas sementes são torradas e utilizadas substituindo o café, devido a grande quantidade de cafeína. Sua utilização

como planta medicinal é antiga, comercializada na forma de extratos líquidos, tinturas e principalmente na forma de chá (LORENZI, 2008). É utilizado na medicina popular como diurético, estimulador da circulação, cardiotônico, redutor de inchaço, como cicatrizante, emoliente, inibidor do apetite e no tratamento de obesidade em programas para perda de peso (SAITO et al., 1986), além de auxiliar na diminuição dos níveis de colesterol total e triglicerídeos, prevenindo a deposição de gorduras nas artérias, embora poucos relatos científicos comprovem tais atividades (SAITO et al. 1986; LORENZI, 2008).

Foi analisada a eficácia da utilização da *Cordia salicifolia* em camundongos submetidos ao tratamento com uma dieta hiperlipidêmica, onde os índices sorológicos de colesterol e triglicerídeos foram monitorados. Os resultados mostraram que a utilização de uma dose de 100 mg/kg/dia do extrato, por via oral, durante 15 dias, promoveu uma diminuição significativa nos níveis séricos de colesterol total, tanto no grupo que recebeu dieta normal e o extrato, quanto no grupo com dieta hiperlipidêmica e o extrato (CARDOZO et al., 2008).

Foi relatado que a dosagem de 20 mg/Kg/dia de *Cordia salicifolia*, administrada em ratos durante 13 dias, promoveu ausência de efeitos antiobesidade, anorexígeno e diurético, porém, houve uma diminuição nos níveis de triglicerídeos (SIQUEIRA et al., 2006).

Avaliou-se a ação farmacológica da espécie, enfocando ensaios antihemorrágicos, antifúngicos, antioxidantes e citotóxicos para células normais e tumorais. Estes ensaios mostraram que a partição acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas apresentou uma porcentagem de inibição

hemorrágica em torno de 75%. As avaliações de atividade antifúngica e antioxidante não apresentaram resultados significativos e também não foi observada citotoxicidade em células normais e células tumorais (ASSONUMA, 2009).

O potencial mutagênico da *Cordia ecalyculata* Vell e *Spirulina maxima* foi avaliado por meio do teste do micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. Concluiu-se que doses de 150 e 500 mg/Kg de *Cordia ecalyculata* foram eficazes na redução de até 13,4% do peso corpóreo dos animais e a associação da *Spirulina maxima* não potencializou a ação da *Cordia ecalyculata* quanto à redução de gordura. As drogas não apresentaram potencial mutagênico (ARALDI et al., 2011).

Em 2004, foi avaliada a toxicidade aguda do extrato hidroetanólico das folhas de *Cordia ecalyculata* (5000 mg/kg), onde este foi administrado durante 15 dias em ratos *Wistar* machos e fêmeas. No último dia os animais foram necropsiados e alterações macroscópicas nos órgãos foram avaliadas. Os resultados indicaram ausência de toxicidade do extrato nos órgãos, este não promoveu mortalidade e não alterou o comportamento dos animais (DIAS, 2004).

A toxicidade do extrato de *Cordia salicifolia* em camundongos submetidos à diferentes doses foi determinada em 2005, onde os autores verificaram que a dose letal (DL50) foi muito maior que 2000 mg/Kg via oral e a DL50 via intraperitoneal foi de 920 mg/Kg em um período de 90 dias. Não foram encontradas evidências que indicasse que a administração do extrato de *Cordia salicifolia* causa efeitos de toxicidade nos animais (CAPARROZ-ASSEF et al., 2005).

3. Plantas medicinais e a Reprodução

A ideia equivocada de que plantas medicinais e fitoterápicos não causam efeitos colaterais representa um perigo, pois não existem estudos científicos que comprovem a eficácia da maioria das plantas e os efeitos que as diferentes doses e associações podem causar no organismo humano (MELLO et al., 2005).

No aspecto reprodutivo, um ou mais componentes químicos de plantas medicinais podem promover prejuízos na fertilidade, na morfologia dos órgãos reprodutores, na gestação, parturição e no desenvolvimento embriofetal (CARVALHO et al., 2009).

A utilização indiscriminada de plantas medicinais sem orientação médica e o desconhecimento dos efeitos secundários e toxicidade oferece risco à saúde da população, sendo muitas vezes, agravado pela falta de informações confiáveis (BELLO et al., 2002), podendo levar a sérias consequências como efeitos colaterais, interações medicamentosas e intoxicações, sendo tão perigoso quanto o uso de “produtos químicos”. Estudos relatam que existem muitos metabólitos na biossíntese das plantas que podem ter efeitos tóxicos, genotóxicos e cancerígenos quando usados continuamente (OLIVEIRA et al., 2006).

Foi relatado que várias plantas utilizadas no dia-a-dia possuem substâncias que podem causar riscos embriotóxicos, teratogênicos e abortivos, se não utilizadas de maneira adequada, uma vez que os constituintes dessas plantas podem atravessar a membrana placentária. Os autores verificaram que plantas como *Angelica archangelica* (angélica), usada como anticoagulante,

Rosmarinus officinales (alecrim), utilizado como antioxidante e antisséptico, assim como *Symphytum officinales* L. (cânfora), *Eucalyptos glóbulos* (eucalipto) como anti-inflamatório, *Cassia agustifolia* (sene) como laxativo, entre outros, são abortivos mediante a quantidade usada e a fase da gestação (RODRIGUES et al., 2011).

A planta *Ruta chalepensis* (Arruda) é usada como anti-helmíntico e anti-hemorragico, sendo contraindicada no período da gravidez por promover contrações uterinas, além de possuir efeito embriotóxico e teratogênico. Da mesma forma as sementes de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*), usadas como antimicrobiano, acarreta a morte embrionária (RODRIGUES et al., 2011).

Na década de 1950, houve redução considerável na taxa de natalidade humana nas áreas rurais da China. Descobriu-se que a redução nos parâmetros reprodutivos masculinos estava relacionada à alimentação, pois era comum o uso de óleo de algodão. As raízes, partes aéreas e sementes do algodão são ricas em gossipol, compostos fenólicos que promovem diminuição na produção de espermatozoides (GADELHA et al., 2001).

A planta *Azadirachta indica*, popularmente conhecida como Nim e utilizada no controle de pragas agrícolas, e na medicina popular no tratamento para catapora e verrugas. Quando administrada dose de 200 mg/kg de peso corpóreo ao longo de 28 dias, diminuiu a fertilidade de ratos e promoveu alterações morfológicas no epitélio seminífero testicular. A integridade desse epitélio foi recuperada após 42 dias do termino do tratamento (D'CRUZ et al., 2010)

Em 2012 foi verificado que *Agave sisalana* (sisal), muito popular no tratamento de doenças hepáticas e cardíacas, causou danos aos túbulos seminíferos de ratos tratados com 100 mg/kg de peso corpóreo em períodos de 30 e 60 dias, sendo que houve redução da fertilidade, no período de tratamento de 60 dias (MENDES et al., 2012).

Foi avaliada a toxicidade reprodutiva de *Cassia occidentalis* sobre a fertilidade de ratos *Wistar*, com o líofilo da planta nas doses de 100, 500 e 2500 mg/kg durante 60 dias, em machos e fêmeas. Não houve toxicidade sistêmica nas doses utilizadas e os parâmetros reprodutivos não foram afetados, porém as doses de 500 e 2500 mg/kg promoveram mortalidade fetal, sendo o uso da planta não recomendado durante a gestação (ANDRADE et al., 2008).

Um levantamento foi realizado no SUS de algumas capitais do Brasil por Carvalho et al., (2008) sobre plantas comumente utilizadas como abortivas, sendo: *Senna Alexandria Mill.*(Sene), *Ruta graveolens L.* (Arruda), *Peumus boldus* (Boldo), *Cabacinha Luffa operculata (Molina)*, *Egletes viscosa* (Marcela), *Cinnamomum verum* (Canela), *Coutarea hexandra* (Quina-quina), *Syzygium aromaticum* (Cravo) e *Himatanthus lancifolius* (Agoniada). Os autores concluíram que muitos princípios ativos destas plantas atravessam a membrana placentária, podendo provocar o aborto. Estas plantas podem causar efeitos variados como: contrações uterinas, as quais prejudicam o organismo das gestantes e possuem ação emenagoga, além de causar alterações anatômicas, baixo peso, prematuridade e anomalias congênitas nos fetos.

Os efeitos de *Ginkgo biloba* e *Panax ginseng* C.A. Meyer foram comparados na reprodução de ratos machos e fêmeas *Wistar*. Veficou-se que

os extratos administrados nas doses de 120 mg/kg de *Ginkgo biloba* e 200 mg/kg de *Panax ginseng* durante 15 dias consecutivos, não promoveram alterações nos testículos e ovários, e não comprometeram o desempenho reprodutivo dos animais (KUNTZE et al., 2012).

Os resultados obtidos por KUNTZE et al. (2012) corrobora com o trabalho realizado por CASTRO et al.(2005), onde a toxicologia de *Ginkgo biloba* foi avaliada sobre a fertilidade de ratos machos tratados com 17 mg/kg por 91 dias e fêmeas por 77 dias. Não foram observadas alterações no peso e na morfologia dos testículos, útero, ovários nem na prole.

Em estudo realizado com *Lepidium meyenil*, popularmente conhecido como “maca”, a administração de 66,7 mg/kg de extrato duas vezes ao dia ao longo de 14 dias, aumentou significativamente o numero de células de Sertoli, células de Leydig e espermátócitos, mas não influenciou a qualidade dos espermatozoides (REATEGUI, 2009).

É relatado que flavonoides e taninos são capazes de ação anti-androgênica, que afeta o sistema reprodutor masculino e a fertilidade (FRACARO, 2004; ANDRADE et al., 2008; SÁ et al., 2010). *Caesalpineia ferrea* (pau-ferro), sendo comumente utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, anti-ulcerogênico, em doenças do trato respiratório, entre outras, é rica em flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e compostos fenólicos. Embora *Caesalpineia ferrea* seja rica em flavonoides, foi demonstrado que não houve efeito tóxico do extrato desta planta em ratos *Wistar* tratados com 300mg /Kg de peso corporal durante 52 dias e 104 dias. A exposição ao extrato de *Caesalpineia ferrea* não afetou a produção de gametas (SÁ et al., 2010).

Em estudo realizado em 2009, ratas prenhes foram tratadas com *Maytens ilicifolia* (espinheira santa) nas doses de 3,9 e 15,1 mg/ Kg durante 20 dias. O tratamento com o extrato não alterou o desenvolvimento fetal, não promoveu efeito teratogênico e não causou toxicidade materna (LAURA, 2009).

Avaliou-se a formulação fitoterápica Gotas Preciosas® contendo: *Gentiana lutea*, (genciana), *Rheum palmatum* (ruibarbo), *Aloe ferox* (aloé), *Cynara scolymus* (alcachofra), *Atropa belladonna* (beladona), *Paumus boldus* (boldo) e *Baccharis trimera* (carqueja), rica em flavonoides, saponinas, alcaloides, taninos entre outros compostos. Foi verificado que mesmo sendo aplicada em concentração 10 vezes maior que a recomendada para humanos (2,14 gotas. Kg⁻¹) não causou efeitos tóxicos nos testículos e epidídimos de ratos tratados por 30 dias e no útero e ovários de ratas tratadas por 44 dias, incluindo período gestacional e de lactação (MELLO et al., 2007).

Em 2005 um estudo verificou que as plantas *Heteropterys afrodisiaca* (nó-de-cachorro) e *Anemopaegma arvense* (vergateza) promoveram aumento no peso dos testículos, aumento no parênquima testicular, no diâmetro dos túbulos seminíferos e no volume do citoplasma das células de Leydig em ratos *Wistar* tratados com os extratos num volume de 0,5 ml durante 56 dias consecutivos (CHIEREGATTO, 2005).

Em 2006, Dimech et al observou que o extrato hidroetanólico de *Mentha crispa* (hortelã-da-folha-miúda) nas concentrações de 0,5 e 1,0 g/Kg de peso corporal não provocou sinais de toxicidade e não alterou as funções reprodutivas de ratos *Wistar*. Confirmaram também que o extrato da planta não apresenta propriedade contraceptiva.

A toxicidade reprodutiva está relacionada a vários efeitos que substâncias de medicamentos e princípios ativos provocam, alterando as funções dos órgãos reprodutores, do sistema endócrino e nervoso. Nos homens além de alterar a produção e maturação de gametas, podem afetar o transporte destes e o comportamento sexual. Nas mulheres, além de muitas substâncias desregularem o ciclo menstrual, podem provocar sangramentos durante a gestação e abortos. Nos fetos, podem promover efeito teratogênico (CASTRO et al., 2005; MENDES, 2012; KUNTZE et al., 2012).

4. Testículos

Os testículos são alojados pela bolsa escrotal, circundados pela túnica vaginal e por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, denominada túnica albugínea. A partir da margem posterior forma-se o mediastino que se divide em lóbulos testiculares, cada qual com a presença de túbulos seminíferos altamente enovelados (TOTSUI et al., 2013; ROSS & PAWLINA, 2012; GOMES, 2011; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008, CHIEREGATTO, 2005).

A gônada masculina (Figura 2) compreende dois compartimentos: (a) tubular, onde ocorre a formação dos espermatozoides a partir da divisão e diferenciação das células germinativas; (b) intersticial, constituído por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado, com vários tipos celulares e as células endócrinas de Leydig (DALAZEN, 2013; CHIEREGATTO, 2005; RUSSELL et al., 1990).

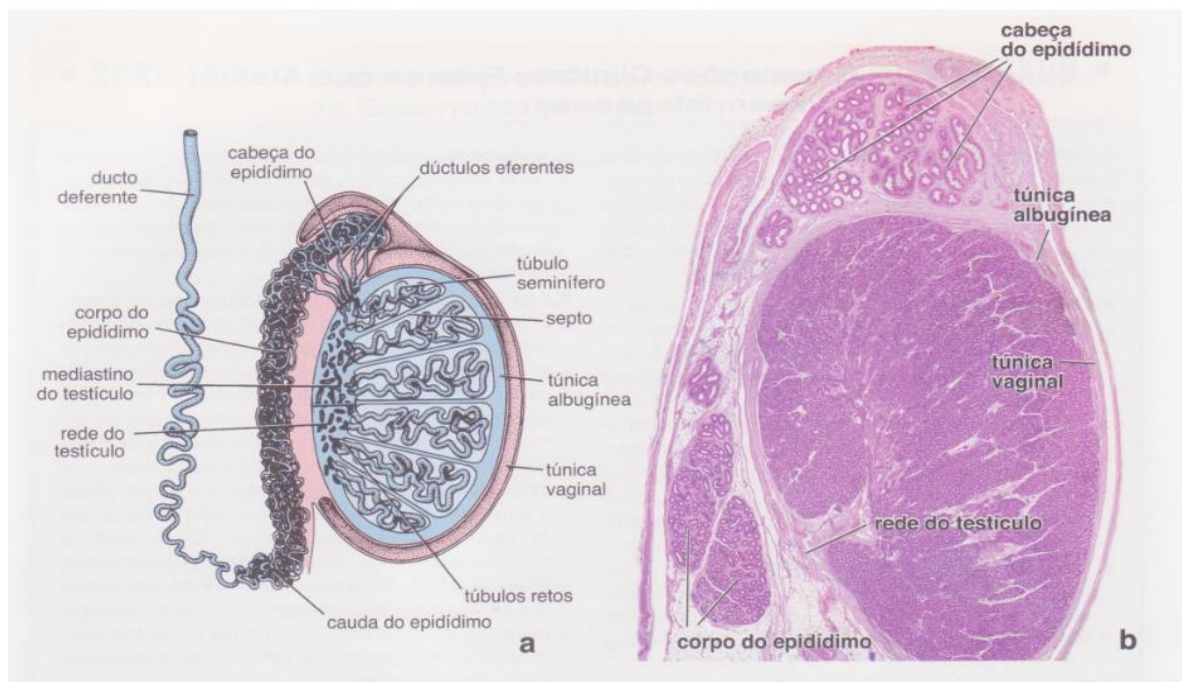


Figura 2. Corte sagital de testículo e epidídimo humano. **a.** diagramação das estruturas testiculares. **b.** Corte histológico de testículo e epidídimo corado com H-E (ROOS; PAWLINA, 2012).

O processo de produção dos espermatozoides, conhecido como espermatogênese, inicia-se na parede dos túbulos seminíferos, a partir das espermatogônias. Estas células no rato se dividem nas linhagens: tipo A (stem cell, de proliferação e de diferenciação), intermediária e tipo B (RUSSELL *et al.* 1990). No rato o processo espermanogênico dura aproximadamente 52 dias (WHEATER *et al.* 1982; SQUIRES *et al.* 1983; JOHNSON *et al.* 2000).

Durante a espermatogênese, o desenvolvimento e a mitose das espermatogônias B dão origem aos espermatócitos primários, em seguida, por meiose os espermatócitos sofrem a primeira divisão originando espermatócitos secundários e numa segunda divisão as espermátides. A espermatogênese no rato possui 14 estágios do ciclo do epitélio seminífero, onde várias transformações ocorrem entre espermatogônia até espermatozoide (DALAZEN, 2013; RUSSELL *et al.*, 1990).

A fase final da produção dos espermatozoides é denominada espermiogênese, onde o núcleo das espermatídes sofre uma diminuição gradativa e completa condensação, ocorre o desenvolvimento do capuz acrossômico que originará o acrossoma, o surgimento do flagelo a partir do alongamentos dos centríolos e a perda de parte do citoplasma, o qual será fagocitado pelas células de Sertoli. (RUSSELL et al., 1990; WHEATER et al., 1982; MEACHEM et al., 2001).

Entre as espermatogônias, no compartimento basal tubular, localizam-se as células de Sertoli, as quais possuem o núcleo geralmente triangular ou oval e nucléolo proeminente; seu citoplasma estende-se até a luz do túbulo preenchendo todos os espaços vazios entre as células da linhagem espermatogênica e fagocitam o citoplasma em excesso que é eliminado pelas espermatídes durante a espermiogênese (BLANCHARD et al., 1996; BOEKELHEDE et al., 2000; ROSS; PAWLINA, 2012).

As células de Sertoli mediam e exercem controle sobre as fases da produção dos espermatozoides e produzem vários metabólitos importantes para manter ativo o processo de espermatogênese e espermiogênese (BOEKELHEDE et al., 2000; BLANCHARD et al., 1996).

O espaço intertubular é preenchido por tecido conjuntivo e nervos, possui vasos que permitem a passagem dos componentes sanguíneos e estão presentes células como fibroblastos, células indiferenciadas e células do sistema imune, como macrófagos, e as células de Leydig, arredondadas com núcleo eosinófilo, rico em lipídios. As células de Leydig são responsáveis pela produção do hormônio testosterona, que atua no desenvolvimento das características masculinas, essencial para a função continuada da

espermato gênese (ROSS & PAWLINA, 2012; O'RAHILLY et al., 2005; RUSSEL et al., 1990).

5. Epidídimo

O epidídimo (Figura 3) é um órgão delgado que se estende entre os polos do testículo, aplicado a margem posterior deste, composto por tecido conjuntivo e vasos. É um ducto longo extremamente enovelado medindo de 4 a 6 m de comprimento no homem, circundado por uma camada de células musculares lisas, é dividido anatômica e histologicamente em: cabeça, com ducto pequeno, epitélio alto com estereocílios e pouca concentração de espermatozoides na luz; corpo, epitélio intermediário com diminuição no número de estereocílios, que se apresentam encurvados e há um aumento na concentração de espermatozoides na luz ductular; cauda, epitélio mais fino, com poucos estereocílios, ducto com o lúmen mais amplo e grande quantidade de espermatozoides neste (WHEATER et al., 1982; VERNET et al., 1997; GARCIA, 2006; OLIVEIRA et al., 2013).

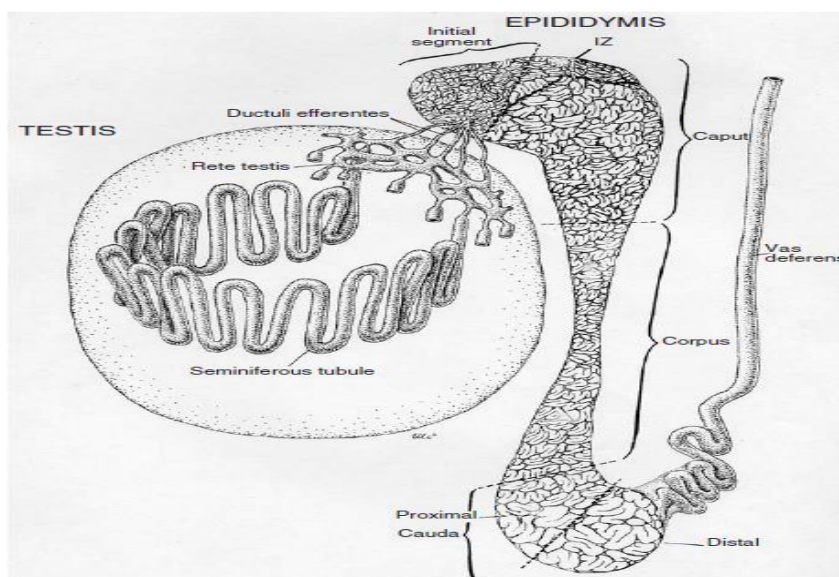


Figura 3. Epidídimo e seus compartimentos (KNOBIL et al., 2006).

Uma das funções do epidídimo é o acúmulo e armazenamento de espermatozoides. O epitélio dos ductos também auxilia na absorção de metabólitos pelos estereocílios (HETEL, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; LUCIANO et al., 2000). No rato o tempo de passagem dos espermatozoides pelo ducto do epidídimo dura aproximadamente 8 dias (CHIEREGATTO, 2005; RUSSELL et al, 1990).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Embora já tenham sido documentados alguns efeitos promovidos pela utilização de *Cordia ecalyculata* Vell com relação à eficácia de emagrecimento, dose letal, atividades citotóxicas e genotóxicas, ainda são desconhecidos seus efeitos sobre a reprodução, sobretudo de maneira dose-dependente. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial tóxico reprodutivo do extrato de *Cordia ecalyculata* em ratos albinos, por meio das seguintes análises:

- Estrutura histológica testicular e epididimária, em microscopia de luz;
- Morfometria dos túbulos seminíferos e ducto epididimário;
- Morfologia espermática do conteúdo luminal da cauda do epidídimo;
- Peso absoluto e peso relativo dos órgãos reprodutivos (testículos, epidídimos, vesículas seminais e prostata);
- Taxa de fertilidade e parâmetros fetais dos machos reprodutores acasalados com fêmeas não tratadas;

**ARTIGO A SER SUBMETIDO
PARA PUBLICAÇÃO NO
PERIÓDICO PHYTOTHERAPY
RESEARCH**

PHYTOTHERAPY RESEARCH**ARTIGO ORIGINAL****Administração do extrato de *Cordia ecalyculata* Vell. Causa toxicidade reprodutiva em ratos adultos**

Mirian Campos dos Santos, Isabel Cristina Cherici Camargo*

Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras, Univ Estadual Paulista - UNESP, Avenida Dom Antônio 2100, 19806-900, Assis, SP, Brasil.

Short title: Efeitos reprodutivos do extrato de *Cordia ecalyculata*

*Autor correspondente

Telefone: +55 018 -33025852

Fax: +55 018 -33025849

Endereço de e-mail: camargo@assis.unesp.br

Resumo

A utilização de extratos de *Cordia ecalyculata* está crescendo devido ao seu potencial em inibir o apetite. Seus efeitos colaterais na reprodução são desconhecidos. Então, o estudo avaliou o potencial tóxico reprodutivo de diferentes doses do extrato de *C. ecalyculata* em ratos adultos. Os animais (n= 12/grupo) receberam o extrato hidroetanólico de *C. ecalyculata* em diferentes doses (20, 100 e 400 mg/kg de peso corpóreo) ou água destilada (grupo Controle). Os tratamentos foram administrados por via oral (gavage), única dose/dia, durante 60 dias consecutivos. Ao final do tratamento, a massa corpórea dos animais que foi similar em ambos os grupos, demonstrando a ineficácia do fitoterápico na redução do peso corporal. O peso dos testículos, vesículas seminais e próstata não foi afetados pelos tratamentos ($p>0,05$), mas houve aumento ($p<0,05$) no peso dos epidídimos na dose de 400 mg/kg do extrato. Em todas as doses, os testículos apresentaram perda de células germinativas, e os epidídimos apresentaram edema e hemorragia intersticial. Houve aumento ($p<0,05$) no percentual de gametas anormais(flagelo curto ou ausente) na cauda do epidídimo, e a taxa de fertilidade foi reduzida ($p<0,05$). Concluiu-se que o extrato de *Cordia ecalyculata* promoveu toxicidade reprodutiva, porém com ausência de efeito dose-dependente.

Palavras-chave: Toxicologia reprodutiva; porangaba, Pholia Magra®; epidídimos; histopatologia; fertilidade.

Introdução

A humanidade, desde a antiguidade, utiliza plantas medicinais para o tratamento e prevenção de diversas patologias. Atualmente, os fitoterápicos são utilizados como uma alternativa para o tratamento de doenças, devido ao fácil acesso e baixo custo do produto em comparação com os produtos sintéticos. O aumento no número de homens e mulheres que procuram medicamentos naturais ou sintéticos que prometem a redução de peso corpóreo cresce a cada ano. A Pholia Magra[®], fitoterápico preparado a partir das folhas e talos de *Cordia ecalyculata*, também conhecida popularmente como *Porangaba*, tem apresentado destaque em razão do efeito diurético e inibidor do apetite (Lorenzi, Matos; 2008).

No Brasil, a *Cordia ecalyculata* Vell. é encontrada desde o nordeste até o sul do país. Seu fruto assemelha-se ao do cafeeiro, razão pela qual possui diversos nomes populares tais como, *café-de-bugre* e *café-do-mato* (Lorenzi, Matos; 2008), além de possuir entre seus constituintes químicos a cafeína.

Embora vários estudos farmacológicos e toxicológicos sejam conduzidos com a grande diversidade de plantas medicinais, ainda são escassos os relatos sobre os efeitos colaterais dessas plantas na reprodução, principalmente no aspecto histopatológico. Previamente foram relatados os efeitos promovidos pela utilização da *C. ecalyculata* com relação à eficácia de emagrecimento, dose letal e atividade citotóxica. No entanto, os efeitos do extrato de *C. ecalyculata* na reprodução são desconhecidos. Assim, é de fundamental importância traçar o perfil do real benefício e dos possíveis efeitos colaterais que este fitoterápico pode promover no organismo. Então, este estudo avaliou o potencial tóxico reprodutivo de diferentes doses do extrato de *C. ecalyculata* em ratos adultos.

Materiais e Métodos

Preparação da solução do extrato vegetal

A Pholia Magra® (*Cordia ecalyculata* Vell.), adquirida comercialmente sem excipiente e com a presença do certificado de análise do controle de qualidade, foi preparada a partir das folhas e talos de *C. ecalyculata*, com solvente de extração hidroetanólico. O laudo da matéria prima comercial atesta a presença de 11,11% de teor de taninos e 9,35% de teor de cafeína.

As soluções foram preparadas imediatamente antes da aplicação nos animais, com a diluição da Pholia Magra® em 1,5 mL de água destilada.

Animais

Foram utilizados 48 ratos albinos *Wistar* com 90 dias de idade e peso médio corpóreo de 350g. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da Univ Estadual Paulista - UNESP (Botucatu, São Paulo, Brasil) e posteriormente foram alojados na Univ Estadual Paulista – UNESP (Assis, São Paulo, Brasil), em sala com temperatura e luminosidade controladas ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de 12h claro-escuro, respectivamente). Os animais receberam dieta padrão e água *ad libitum*. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos da pesquisa animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (Registro 010/2011).

Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=12/grupo): grupos C20, C100 e C400, tratados respectivamente com 20, 100 e 400 mg/kg de peso corpóreo do extrato de *Cordia ecalyculata* e tratado com 1,5 mL de água

destilada (Controle - Co). As doses foram administradas por via oral (gavage), uma vez ao dia, durante 60 dias consecutivos, no mesmo horário (8:00-9:00h). A escolha das doses baseou-se em estudo prévio (Caparroz-Assef *et al.* 2005), que relatou que a dose terapêutica para camundongos foi de 20 mg/kg.

Peso corpóreo e coleta dos órgãos reprodutivos

Os animais foram pesados semanalmente e ao final do período experimental, seis ratos/grupo foram induzidos à morte e os órgãos reprodutivos foram coletados e processados por técnicas histológicas. Os seis ratos restantes de cada grupo foram acasalados e destinados ao estudo da fertilidade. Após o sacrifício dos animais com dose letal de Tiopental Sódico (Thiopentax®, Cristalia, São Paulo, Brazil), via i.p., foram coletados e pesados os testículos, epidídimos, próstata e vesículas seminais cheias e vazias. Foi registrado o peso absoluto (g) e relativo (g%; peso do órgão dividido pelo peso corpóreo X 100) de cada órgão.

Análise histopatológica

Os testículos e o epidídimo esquerdo foram fixados em solução de Bouin, desidratados em soluções crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Paraplast Labware-Oxford, St.Louis, MO, USA). Secções de 5-µm de espessura foram coradas com Hematoxilina e eosina (HE), Tricrômico de Mallory e PAS-H, para evidenciar os componentes celulares e a matriz extracelular. As lâminas de testículo e epidídimo foram analisadas qualitativamente. No ducto epididimario foi avaliada cada região anatômica do órgão (cabeça, corpo e cauda). As imagens foram obtidas através de um microscópio óptico Zeiss (Scope A1-Axio) acoplado com câmera de vídeo AxioCam ICc3 e digitalizadas por meio do *software* Axio Vision, versão 4.7.2.

Análise morfométrica

Nos testículos de cada animal foram escolhidas ao acaso 20 secções transversais de túbulos seminíferos, para a mensuração do diâmetro tubular, altura do epitélio germinativo, área luminal e área tubular, na objetiva de 20x. Nos epidídimos, foram escolhidas aleatoriamente em cada animal, 10 secções transversais de cada segmento anatômico do órgão, para mensuração da altura do epitélio, área luminal e área ductular, na objetiva de 10x. As mensurações nos testículos e epidídimos foram efetuadas em microscópio óptico Zeiss Axio Scope A1, acoplado ao sistema de captura com câmara Axio Cam ICc3, contendo o programa Axio Vision versão 4.7.2.

Morfologia espermática

Na cauda do epidídimo direito de cada animal foram obtidos os espermatozoides, através da técnica descrita por Vigil & Bustos-Obregón (1985). Os esfregaços foram corados com Hematoxilina e Shorr, para análise da morfologia espermática em microscópio de luz, na objetiva de 100X. Foram analisados 100 espermatozoides de cada animal, classificados em dois grupos: gameta normal (normotipo) e anormal (teratospérmico), conforme os critérios de avaliação da morfologia da cabeça e flagelo do gameta (Narayana *et al.* 2002).

Teste de fertilidade e parâmetros fetais

Seis ratos de cada grupo foram destinados ao teste de fertilidade no final do período de tratamento. Os animais foram acasalados com fêmeas na proporção 1:1. Na manhã seguinte, a presença de espermatozoides no lavado vaginal foi considerado o 1º dia gestacional (DG1).

No DG19, as fêmeas foram previamente anestesiadas com Ketamina (40 mg/kg) e Xilasina (20 mg/kg), via intramuscular, e foi realizada a laparotomia. Os cornos uterinos grávidos e os ovários foram expostos, obtendo-se os seguintes registros: tamanho e peso da ninhada, peso fetal, número de implantes, número de corpos lúteos grávidos, viabilidade fetal, número de reabsorções e peso das placentas. Foram calculadas as taxas de perda pré-implantação (n° de corpos lúteos – n° de implantes/ n° de corpos lúteos x 100) e perda pós-implantação (n° de implantes – n° de fetos/ n° de implantes x 100), taxa de fertilidade (n° de fêmeas com espermatozoides no esfregaço/ n° de fêmeas acasaladas x 100) e taxa de gestação (n° fêmeas com fetos viáveis/ n° de fêmeas com espermatozoides no esfregaço x 100), de acordo com Weidner & Sigwart (2001) e Damasceno *et al.* (2008).

A fetotoxicidade foi avaliada pela morfologia externa, conforme os critérios: anormalidades do tronco e cauda, extremidades (tamanho, posição e dígitos), contorno do crânio, aspecto dos olhos e orelhas e exame da face e focinho.

Sinais e sintomas clínicos de toxicidade

Diariamente os animais foram monitorados quanto aos sintomas clínicos de toxicidade (piloereção, alteração no comportamento, tremores e morte) e sinais clínicos de toxicidade (consumo de ração e água, mensurados três vezes na semana em dias alternados), conforme descritos por Fernandes *et al.* (2010). O peso corpóreo foi registrado semanalmente.

Análise estatística

Foram realizados testes de normalidade e homocedasticidade. Os dados foram analisados por meio da análise de variância paramétrica ANOVA, complementada com

o teste de Tukey, quando apresentaram normalidade, e foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Na ausência de normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado com o teste de Dunn, e os resultados foram expressos como mediana $\pm$ desvio interquartilico. As taxas de fertilidade e gestação, e o percentual de espermatozoides anormais foram analisados através do teste Qui-quadrado (X^2). A significância estatística foi dada para $p < 0,05$.

Resultados

O consumo de alimento e água foi similar ($p > 0,05$) nos grupos Co e C100 (Tabela 1). Os animais do grupo C20 ingeriram quantidade significativamente maior de ração, enquanto que no grupo C400 a ingestão alimentar foi significativamente menor. O consumo de água foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos grupos C20 e C400, comparativamente aos grupos Co e C100 (Tabela 1).

A administração do extrato de *Cordia ecalyculata* nas doses de 20, 100 e 400 mg/kg de peso corpóreo não promoveu alteração significativa no peso corpóreo final dos ratos, comparativamente ao grupo controle (Tabela 1). Na comparação entre os grupos que receberam o extrato, o peso corpóreo dos ratos do grupo C400 foi reduzido significativamente ($p < 0,05$) em comparação ao grupo C20. Ao longo do período de tratamento, o ganho de peso dos animais dos grupos C100 e C400 foi inferior ao observado nos grupos Co e C20 (Figura 1).

Na avaliação do peso dos órgãos reprodutivos, o peso absoluto e relativo dos testículos, vesículas seminais e próstata não foram afetados pelos tratamentos ($p > 0,05$), mas houve aumento ($p < 0,05$) no peso relativo dos epidídimos na dose de 400 mg/kg, comparativamente aos grupos Co e C20 (Tabela 1).

A análise histopatológica dos testículos mostrou que os grupos tratados com as diferentes doses do extrato (Figuras 2C-H), apresentaram alterações tubulares, comparativamente ao grupo controle (Figuras 2A-B). Os animais do grupo controle apresentaram túbulos seminíferos com epitélio constituído por várias camadas de células germinativas, dispostas de forma altamente organizada (Figuras 2A-B) e com espermatozoides na luz. O interstício tubular, constituído por tecido conjuntivo frouxo, apresentou células de Leydig com morfologia característica, próximas aos vasos sanguíneos. Todos os grupos tratados com *C. ecalyculata* apresentaram desprendimento de camadas de células germinativas do epitélio seminífero, resultando na presença de células imaturas na luz tubular (Figuras 2C-D, E e F). Nos grupos C100 e C400 houve a presença marcante de corpos residuais na luz dos túbulos seminíferos. Células em degeneração, caracterizadas pela picnose nuclear e acidofilia citoplasmática, foram observadas em posição periluminal (Figura 2H) no grupo tratado com a dose mais alta do extrato (400 mg/kg). As células de Leydig apresentaram padrão morfológico semelhante ao grupo Co, nos grupos C20, C100 e C400.

A análise morfométrica testicular (Tabela 2) mostrou que houve aumento significativo ($p < 0,05$) na área tubular do grupo C400, comparativamente ao grupo Co. A área luminal, o diâmetro tubular e a altura epitelial foram similares ($p > 0,05$) nos grupos experimentais.

O tecido epididimário exibiu alterações histopatológicas nos animais tratados com as 3 doses do extrato (Figuras 3D-L) em comparação ao grupo controle (Figuras 3A-C). O epitélio ductular na reigão do corpo apresentou células em processo de degeneração, caracterizadas pelo núcleo picnótico e citoplasma vacuolizado (Figura 3K). Espermatozoides com flagelo curto ou ausente, células germinativas imaturas e células gigantes multinucleadas foram observados na luz do ducto (Figuras 3E e G). O

interstício ductular nas diferentes regiões do órgão e nas 3 doses do extrato apresentou aspecto edematoso e hemorrágico, com vasos sanguíneos congestionados e células do sistema imune dispersas no tecido (Figuras 3D, F, G, H, I e J). No grupo que recebeu a menor dose do extrato (C20), massas amorfas representativas de *debris celulares* estiveram presentes na luz ductular. No grupo C400 houve espessamento da camada muscular que circunda o ducto epididimário na região da cauda (Figura 3L).

A análise morfométrica epididimária (Tabela 2) mostrou que na região da cabeça, a área ductular, área luminal e altura do epitélio foram similares ($p>0,05$) entre os grupos. Houve diferença significativa ($p<0,05$) na área luminal do ducto na região do corpo, onde o grupo C20 apresentou maior área que os grupos Co e C400. A altura do epitélio ductular da cauda do epidídimo foi reduzida ($p<0,05$) nos grupos C100 e C400, em comparação ao grupo Co.

Na avaliação da morfologia espermática, a porcentagem de gametas com morfologia anormal foi significativamente maior ($p<0,05$) nos grupos tratados com o extrato de *C. ecalyculata* nas diferentes doses, quando comparada ao grupo Co (Tabela 2). Os gametas apresentaram anomalias de flagelo caracterizadas pela ausência ou encurtamento flagelar.

O índice de fertilidade dos ratos dos grupos tratados com o extrato foi similar ($p>0,05$) ao grupo controle. No entanto, o índice de gestação foi reduzido significativamente ($p<0,05$) nos grupos C20 e C100 (66,6%) e no grupo C400 (50%), comparativamente ao grupo Co (Tabela 3).

O peso corpóreo da matriz acasalada com machos tratados foi menor no grupo que recebeu a dose mais alta do extrato (400 mg/kg), porém diferiu significativamente ($p<0,05$) apenas do grupo C20. O peso fetal foi reduzido ($p<0,05$) no grupo C400, em comparação grupo Co (Tabela 3). Não houve influência ($p>0,05$) dos tratamentos sobre

o peso do útero gravídico, peso das placentas, tamanho e peso da ninhada, e taxas de perda pré-implantação e pós-implantação (Tabela 3).

Quanto aos sintomas clínicos de toxicidade, houve o registro de ocorrência de mortalidade em apenas um animal do grupo C100 e C400. Outros sintomas, tais como, piloereção e tremores não foram observados, mas as doses de 20 e 100 mg/kg promoveram hiperatividade nos animais e a dose de 400 mg/kg reduziu a atividade após as primeiras horas da administração dos extratos.

Discussão

Existem poucos estudos na literatura a respeito da *Cordia ecalyculata*. O extrato da planta, administrado em diferentes concentrações aos ratos albinos deste estudo, não afetou o peso corpóreo e o peso dos testículos, vesículas seminais e próstata, mas promoveu alterações histopatológicas nos testículos e epidídimos, aumentou a frequência de espermatozoides anormais e reduziu a taxa de gestação.

No presente estudo, a ausência de redução no peso corpóreo dos animais tratados com as concentrações de 20, 100 e 400 mg/kg do extrato, demonstrou a ineficácia do fitoterápico como método alternativo para emagrecer. Resultado semelhante foi relatado por outros autores (Caparroz-Assef et al. 2005; Siqueira et al. 2006; Silva et al. 2010). O possível efeito emagrecedor atribuído à *C. ecalyculata* pode ser decorrente da sua propriedade diurética, observada nesse estudo pelo aumento no consumo hídrico dos animais dos grupos C20 e C400. Esta propriedade é atribuída principalmente aos metabólitos da cafeína que atua aumentando o débito sanguíneo renal e a filtração glomerular (Rates, 2010). Há relatos de ausência de efeito da *C. ecalyculata* no consumo de ração e água dos animais (Siqueira et al. 2006; Silva et al. 2010). O menor consumo alimentar observado nos ratos do grupo C400 resultou em menor peso corpóreo, comparativamente ao grupo C20 que apresentou maior consumo alimentar. A

ação do extrato no consumo alimentar parece atuar de forma bifásica, em menor dose aumentando a ingestão de ração e em maior dose diminuindo o consumo. A cafeína parece ter o mesmo efeito quando introduzida na dieta de ratos Sprague-Dawley (Wüzner et al. 1977; Gans, 1984).

O peso absoluto e relativo dos testículos, vesículas seminais e próstata não foram influenciados pelas diferentes concentrações do extrato da planta. As alterações morfológicas observadas no tecido testicular dos ratos não interferiram no peso do órgão. É possível que a estrutura tecidual tenha se alterado primeiramente, sem, contudo, promover concomitantemente alteração no peso testicular.

O peso relativo do epidídimo no grupo C400 foi maior que os demais grupos, provavelmente devido ao aumento na espessura da camada muscular circundante ao ducto na região da cauda, conforme observado nas secções histológicas. Este resultado pode ser devido à ação da cafeína, que em estudo prévio (Sorobo et al. 2012) promoveu aumento da musculatura lisa em áreas da próstata ventral de ratos. Da mesma forma que a próstata, o epidídimo é um órgão andrógeno-dependente, que pode ter respondido similarmente à ação da cafeína presente no extrato de *C. ecalyculata*.

As alterações histopatológicas promovidas pelo extrato no tecido testicular e epididimário deste estudo podem ser atribuídas à metilxantina cafeína e seus diversos metabólitos, como a teobromina ou a ação sinérgica desses compostos com os taninos, que devido à propriedade dos taninos de se ligarem a proteínas e outras macromoléculas, faz com que eles atuem como uma via de toxicidade (Monteiro *et al.* 2005). Em estudos com ratos que receberam dieta complementada com cafeína e teobromina houve efeitos tóxicos testiculares. A teobromina causou extensos danos aos testículos, que apresentaram áreas com o epitélio seminífero degenerado, sinais de necrose, formação celular multinucleada (Gans, 1982) e áreas de interstício edematoso

com aparente proliferação de arteríolas (Tarka et al., 1981), enquanto que a cafeína promoveu áreas de vacuolização epitelial seminífera (Gans, 1984). Em estudo realizado por Sorobo et al. (2012) o desenvolvimento de hiperplasia prostática foi atribuído ao uso da cafeína. No presente estudo, o epitélio seminífero dos testículos e o epitélio ductular epididimário, assim como o interstício do ducto genital, foram afetados pelo tratamento fitoterápico nas três doses avaliadas. A presença de células germinativas imaturas e *debris celulares* no lúmen do ducto epididimário ocorreu devido à descamação de células do epitélio seminífero testicular. As diversas doses do fitoterápico não promoveram alterações morfológicas nas células de Leydig, similarmente ao estudo em testículos de galos (*Gallus domesticus*) que receberam alimentação complementada com cafeína (Ax et al., 1976).

A morfologia dos espermatozoides foi afetada pelo tratamento com *Cordia ecalyculata*, em todas as concentrações do extrato. As anormalidades espermáticas principais foram a presença de flagelo curto ou ausência flagelar. Ekaluo et al. (2013) relataram que a cafeína presente em extrato de *Annona muricata* induziu à redução na quantidade, motilidade e viabilidade espermática, e aumentou a porcentagem de espermatozoides com anomalias de cabeça em ratos. Erros ocorridos durante o processo da espermiogênese nos túbulos seminíferos é o caráter formador das teratospermias. Possivelmente as substâncias químicas presentes no extrato de *C. ecalyculata* atuaram nas organelas envolvidas na formação do aparato flagelar.

A toxicidade testicular e epididimaria observada nos animais tratados com o extrato, nas suas diferentes doses pode ter ocorrido devido a uma ação direta de um ou mais componentes químicos da *C. ecalyculata* sobre os órgãos e/ou uma ação indireta sobre o eixo neuroendócrino. Embora no presente estudo não tenha sido realizado a dosagem hormonal de FSH, LH, testosterona e DHT, estudo conduzido por Sorobo, et

al., (2012) mostrou que nos ratos tratados com cafeína houve aumento nos níveis plasmáticos de testosterona.

A taxa de fertilidade dos ratos não foi influenciada pelas diferentes doses do extrato, mas houve redução na taxa de gestação com indicação que a capacidade fecundante do gameta foi prejudicada. Quanto aos parâmetros maternos e fetais, apenas o peso corpóreo da matriz foi reduzido no grupo tratado com a concentração mais alta do extrato (400mg/kg), provavelmente devido à redução no consumo alimentar. Este efeito promoveu redução no peso fetal, cuja quantidade de nutrientes transportados pela membrana placentária foi prejudicada.

Os animais tratados com a maior dose do extrato exibiram como sintoma clínico a hipoatividade, enquanto que aqueles que receberam a menor dose e a dose intermediária tornaram-se hiperativos. Dentre os componentes do extrato de *porangaba*, a cafeína é a que apresenta maior potencial como estimulador da atividade motora (Nehlig et al., 1992) tendo seu efeito máximo principalmente em doses intermediárias em humanos (10 mg/kg a 30 mg/kg de peso corpóreo). Em ratos, doses acima de 100 mg/kg não causaram alteração comportamental (Solinas et al., 2002).

Embora o índice de mortalidade apresentou-se baixo nos grupos C100 e C400, o resultado demonstra que a *C. ecalyculata* possui vias de toxicidade, devido às possíveis alterações metabólicas no organismo, sendo possível a interação isolada ou sinérgica de seus constituintes. De acordo com Caparroz-Assef et al. (2005) a dose letal (DL50) do extrato da planta, quando administrado em camundongos, foi muito maior que 2000 mg/kg (via oral), uma dose superior às do presente estudo. Há relato de baixa atividade clastogênica do extrato, quando administrado para camundongos em tratamento agudo e crônico, de 24 horas e 15 dias, respectivamente (Silva et al., 2010).

Em conclusão, a administração oral de *Cordia ecalyculata* Vell, promoveu

toxicidade reprodutiva, porém com ausência de efeito dose-dependente em ratos albinos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio financeiro (Processo 2012/17016-4).

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

Ax RL, Collier RJ, Lodge JR. 1976. Effects of dietary caffeine on the testis of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *J Reprod Fert* **47**: 235-238.

Caparroz-Assef MS, Davis SM, Batista RCF, Bersani-Amado FA, Baroni S, Dantas JA, Cuman RKN, Bersani-Amado CA. 2005. Toxicity studies of *Cordia salicifolia* extract. *Acta Sci Health* **27**: 41-44.

Damasceno DC, Kempinas, WG, Volpato GT, Consonni M, Rudge MVC, Paumgarten FJR. 2008. *Anomalias congênitas – Estudos experimentais* (1st edn). Belo Horizonte: Editora Médica.

Ekaluo UB, Ikpeme EV, Ibiang YB, Omordia FO. 2013. Effect of soursop (*Annona muricata* L.) fruit extract on sperm toxicity induced by caffeine in albino rats. *J Med Sci* **13**: 67-71.

Ferro D. 2008. *Fitoterapia – Conceitos clínicos*. São Paulo: Editora Atheneu.

- Gans JH. 1982. Dietary influences on theobromine-induced toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **63**: 312-320.
- Gans JH. 1984. Comparative toxicities of dietary caffeine and theobromine in the rat. *Fd Chem Toxic* **22**: 365-369.
- Lorenzi H, Matos FJA. 2008. *Plantas medicinais no Brasil – Nativas e exóticas* (2nd edn). Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL. 2005. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova* **28**: 892-896.
- Nehlig A, Daval JL, Gérard D. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev* **17**: 139-170.
- Rates SMK. 2010. Metilxantinas. In *Farmacognosia – Da planta ao medicamento*, Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, JCP, Mentz LA, Petrovick PR (6th edn). Porto Alegre: Editora UFRGS/Editora UFSC; 885-901.
- Saito ML, Oliveira F. 1986. Características físicas e químicas do extrato fluido de *Cordia ecalyculata* Vell – Boraginaceae. *Rev Bras Farmacogn* **1**: 3-11.
- Silva CJ, Bastos JK, Takahashi CS. 2010. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. *J Ethnopharmacol* **127**: 445-450.
- Siqueira VLD, Cortez DAG, Oliveira CE, Nakamura CV, Bazotte RB. 2006. Pharmacological studies of *Cordia salicifolia* Cham in normal and diabetic rats. *Braz Arch Biol Technol* **49**: 215-218.

Solinas M, Ferré S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg S. 2002. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci* **22**: 6321-6324.

Sorobo C, Lacorte M, Martins M, Rinaldi JC, Moroz A, Scarano WR, Delella FK, Felisbino SL. 2012. Chronic caffeine intake increases androgenic stimuli, epithelial cell proliferation and hyperplasia in rat ventral prostate. *Int J Exp Path* **93**: 429-437.

Tarka SM, Zoumas BL, Gans JH. 1981. Effects of continuous administration of dietary theobromine on rat testicular weight and morphology. *Toxicol appl Pharmacol* **58**: 76 - 82.

Vigil P, Bustos-Obregón E. 1985. Alkylating agents and mouse spermatogenesis: Effects of a single dose of cyclophosphamide. *Andrologia* **17**: 276-282.

Weidner MS, Sigwart K. 2001. Investigation of the teratogenic potential of a *Zingiber officinale* extract in the rat. *Reprod Toxicol* **15**: 75-80.

Würzner HP, Lindström E, Vuataz L. 1976. A 2-year feeding study of instant coffees in rats. I. Body weight, food consumption, haematological parameters and plasma chemistry. *Fd Cosmet Toxicol* **15**: 7-16.

Legenda das figuras

Figura 1. Curva de ganho de peso(g) durante o período experimental nos diferentes grupos.

Figura 2. Fotomicrografias de testículos de ratos dos grupos: Co (A, B), C20 (C, D), C100 (E, F) e C400 (G, H). Observar a integridade morfológica dos túbulos seminíferos no grupo controle e as alterações histopatológicas nos grupos tratados com o extrato de

Cordia ecalyculata, caracterizadas pela desorganização do epitélio seminífero, presença de células germinativas imaturas na luz (gi), áreas desprovidas de células no epitélio, escassez de espermatozoides na luz tubular e presença de células germinativas em degeneração (cd). Túbulos seminíferos (ts) e interstício tubular (i). PAS-H (A, C, D); Tricrômico de Mallory (B, G, H); HE (E, F).

Figura 3. Fotomicrografias de epidídimo de ratos dos grupos: Co (A, B, C), C20 (D, E, F), C100 (G, H, I) e C400 (J, K, L), nas regiões da cabeça, corpo e cauda. Nos grupos tratados com o extrato de *Cordia ecalyculata*, observar o extravasamento de hemácias (h) no interstício, vaso sanguíneo congesto (vs), espermatozoides na luz (spz), células em degeneração no epitélio ductular (seta, destaque em K) e camada espessa de músculo liso (cm) circundante ao ducto. Em E, é dado destaque à presença de células gigantes multinucleadas na luz ductular. Em G, é dado destaque à presença de espermatozoides com flagelo curto ou ausência flagelar. Ducto epididimário (de) e interstício (i). HE (A, B); Tricrômico de Mallory (C-L).

Tabela 1. Consumo médio de ração (g) e água (mL), peso corpóreo inicial e final (g) e peso absoluto (g) e relativo (g%) dos órgãos reprodutivos nos diferentes grupos experimentais (N=12/grupo).

	Co	C20	C100	C400
Parâmetros				
Consumo de ração	105 ± 11 a	115 ± 11,5 b	107 ± 16 a	93 ± 18 c
Consumo de água	150 ± 22,7 a	185 ± 41,2 b	150 ± 25 a	200 ± 110 b
Peso corpóreo (g)				
Inicial	368,0 ± 45,7 a	343,6 ± 24,8 a	333,8 ± 24,8 a	332,5 ± 38,4 a
Final	457,1 ± 69,3 ab	479,3 ± 42,8 a	441,5 ± 37,8 ab	410,1 ± 51,2 b
Peso dos testículos				
g	3,15 ± 1,17 a	3,71 ± 0,32 a	3,29 ± 0,03 a	3,53 ± 0,09 a
g%*	0,69 ± 0,11 a	0,72 ± 0,07 a	0,76 ± 0,11 a	0,84 ± 0,11 a
Peso dos epidídimos				
g	1,37 ± 0,38 a	1,41 ± 0,11 a	1,48 ± 0,05 a	1,66 ± 0,10 a
g%*	0,29 ± 0,03 a	0,28 ± 0,02 a	0,32 ± 0,03 ab	0,38 ± 0,05 b
Peso das vesículas				
seminais cheias				
g	2,07 ± 0,44 a	2,16 ± 0,51 a	1,92 ± 0,35 a	1,73 ± 0,14 a
g%	0,46 ± 0,07 a	0,43 ± 0,09 a	0,42 ± 0,09 a	0,42 ± 0,06 a
seminais vazias				
g	1,14 ± 0,34 a	1,41 ± 0,22 a	1,21 ± 0,25 a	1,14 ± 0,20 a
g%	0,29 ± 0,10 a	0,28 ± 0,04 a	0,27 ± 0,08 a	0,28 ± 0,05 a
Peso da próstata				
g*	0,86 ± 0,64 a	1,25 ± 0,45 a	0,88 ± 0,08 a	0,91 ± 0,28 a
g%*	0,20 ± 0,08 a	0,25 ± 0,06 a	0,17 ± 0,09 a	0,24 ± 0,04 a

Valores expressos como mediana ± desvio interquartilico; Kruskal-Wallis; teste de Dunn. * Valores expressos como média ± desvio padrão; ANOVA; teste de Tukey. Letras diferentes na mesma linha

indicam que os valores diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Co: grupo controle; C20: grupo tratado com 20 mg/kg do extrato; C100: grupo tratado com 100 mg/kg do extrato; C400: grupo tratado com 400 mg/kg do extrato.

Tabela 2. Análise morfométrica testicular e epididimária, e percentual de espermatozoides anormais nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Co	C20	C100	C400
Testículos				
Área tubular (μm^2)	62411,9 $\pm$ 6364,3 a	69187,8 $\pm$ 8595,6 ac	64556,4 $\pm$ 4546,9 ab	68312,0 $\pm$ 51335,5 bc
Área luminal (μm^2)	12095,7 $\pm$ 2741,1 a	15613,0 $\pm$ 3982,8 a	14606,5 $\pm$ 2599,5 a	18063,3 $\pm$ 5133,5 a
Diâmetro tubular (μm)	277,2 $\pm$ 15,7 a	293,0 $\pm$ 16,2 a	286,2 $\pm$ 9,4 a	294,7 $\pm$ 8,3 a
Altura epitelial (μm)	83,1 $\pm$ 8,2 a	81,6 $\pm$ 5,7 a	77,6 $\pm$ 5,6 a	79,3 $\pm$ 3,5 a
Epidídimos				
Cabeça				
Área ductular (μm^2)	29928,9 $\pm$ 2689,1 a	304477,8 $\pm$ 12857,9 a	35414,9 $\pm$ 8581,0 a	29326,5 $\pm$ 8615,6 a
Área luminal (μm^2)	12852,0 $\pm$ 118,8 a	14536,5 $\pm$ 6206,5 a	17843,6 $\pm$ 6222,8 a	12783,1 $\pm$ 2362,8 a
Altura epitelial (μm)*	33,0 $\pm$ 7,04 a	31,0 $\pm$ 8,70 a	32,9 $\pm$ 9,46 a	28,8 $\pm$ 8,05 a
Corpo				
Área ductular (μm^2)	91978,1 $\pm$ 33595,1 a	68482,8 $\pm$ 9950,2 a	98657,4 $\pm$ 21634,5 a	86318,6 $\pm$ 14905,8 a
Área luminal (μm^2)	68636,4 $\pm$ 29921,9 a	102175,7 $\pm$ 24215,7 b	76328,2 $\pm$ 20291,6 abc	68507,4 $\pm$ 19307,0 ac
Altura epitelial (μm)	24,3 $\pm$ 1,54 a	22,8 $\pm$ 3,35 a	19,8 $\pm$ 0,04 a	19,4 $\pm$ 8,53 a
Cauda				
Área ductular (μm^2)	176434,49 $\pm$ 70301,0 a	168126,2 $\pm$ 34129,2 a	198697,9 $\pm$ 65329,50 a	208387,6 $\pm$ 80995,7 a
Área luminal (μm^2)*	152205,2 $\pm$ 76286,9 a	135677,4 $\pm$ 2804,8 a	200876,8 $\pm$ 43613,8 a	214193,7 $\pm$ 94557,0 a
Altura epitelial (μm)	21,6 $\pm$ 3,27 a	18,6 $\pm$ 1,08 ab	14,3 $\pm$ 1,28 b	14,05 $\pm$ 3,48 b
Gametas anormais (%)	1,16 $\pm$ 1,60 a	20,17 $\pm$ 1,72 b	18,40 $\pm$ 4,39 b	11,20 $\pm$ 11,38 b

Valores expressos em mediana $\pm$ desvio interquartilico; *média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam que os valores diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Co: grupo controle; C20: grupo tratado com 20 mg/kg do extrato; C100: grupo tratado com 100 mg/kg do extrato; C400: grupo tratado com 400 mg/kg do extrato.

Tabela 3. Parâmetros reprodutivos e fetais em cada grupo experimental.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Co	C20	C100	C400
Índice de fertilidade* (%)	100 a	100 a	100 a	100 a
Índice de gestação* (%)	100 a	66,6 b	66,6 b	50 b
Peso corpóreo materno (g)	359,00 ± 41,29 ab	428,50 ± 28,71 a	365 ± 12,25 ab	320 ± 42,00 b
Peso do útero gravídico (g)	41,92 ± 11,83 a	45,74 ± 2,78 a	37,95 ± 15,30 a	33,17 ± 7,15 a
Peso das placentas (g)	5,70 ± 1,10 a	6,50 ± 2,03 a	5,71 ± 1,98 a	4,33 ± 1,39 a
Peso da ninhada (g)	21,17 ± 5,45 a	21,07 ± 2,71 a	18,39 ± 7,32 a	15,80 ± 3,28 a
Tamanho da ninhada	12,00 ± 2,25 a	12,50 ± 1,75 a	10,50 ± 4,75 a	10,00 ± 1,00 a
Peso fetal (g)	1,79 ± 0,24 a	1,72 ± 0,18 ab	1,71 ± 0,16 ab	1,65 ± 0,22 b
Perda pré-implantação (%)	0 ± 0 a	6,69 ± 4,23 a	3,84 ± 8,26 a	0 ± 0 a
Perda pós-implantação (%)	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a

Valores expressos em mediana ± desvio interquartilico. * teste do X^2 , n=6. Pelo menos uma

letras diferentes na mesma linha indica que os valores diferem estatisticamente entre si (p

<0,05).

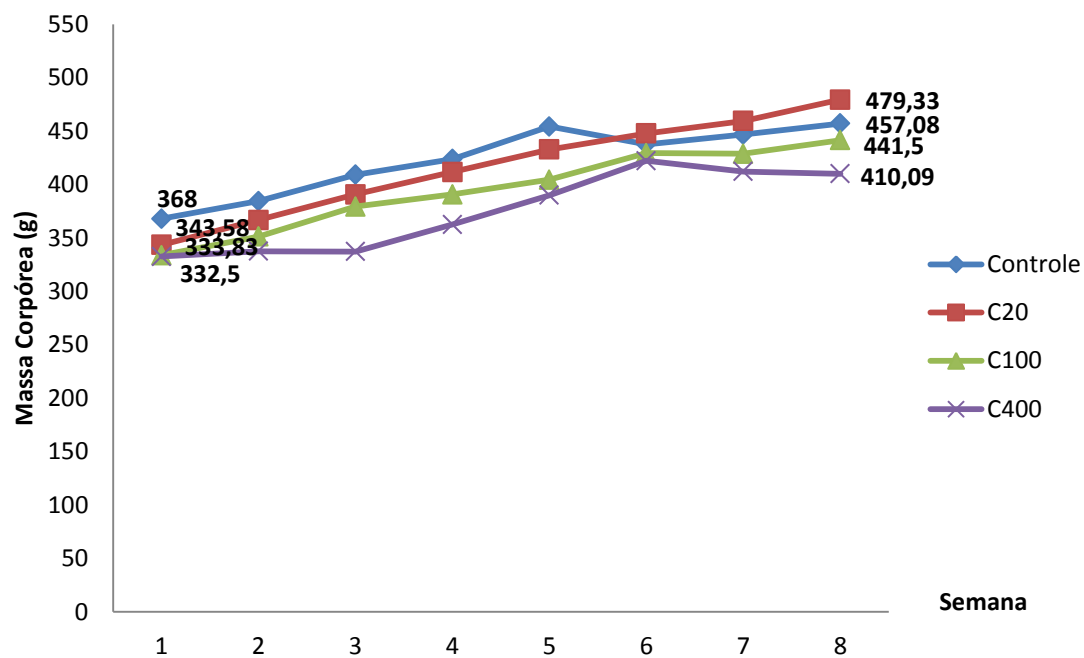


Figura 1. Curva de ganho de peso(g) durante o período experimental nos diferentes grupos

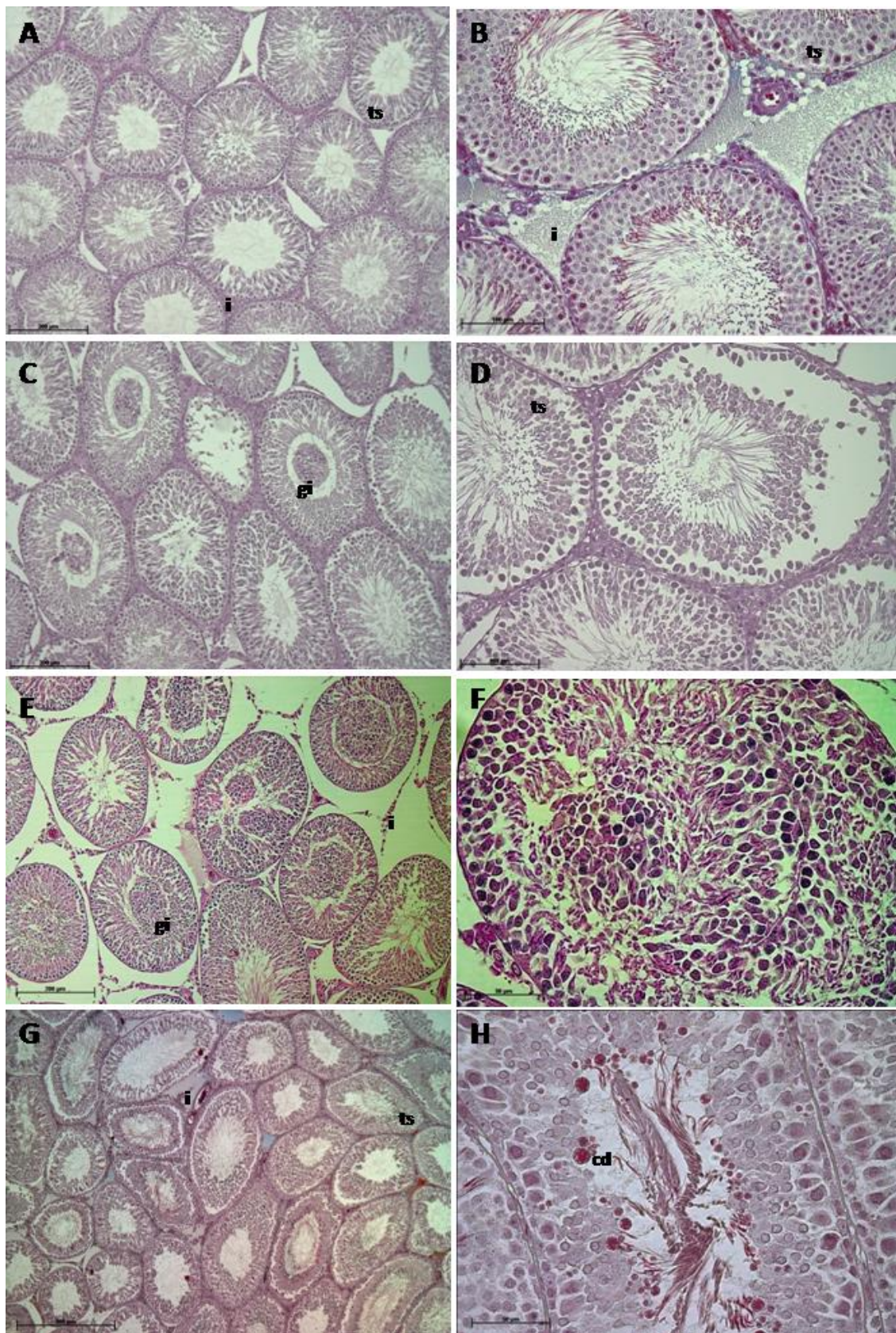


Figura 2.

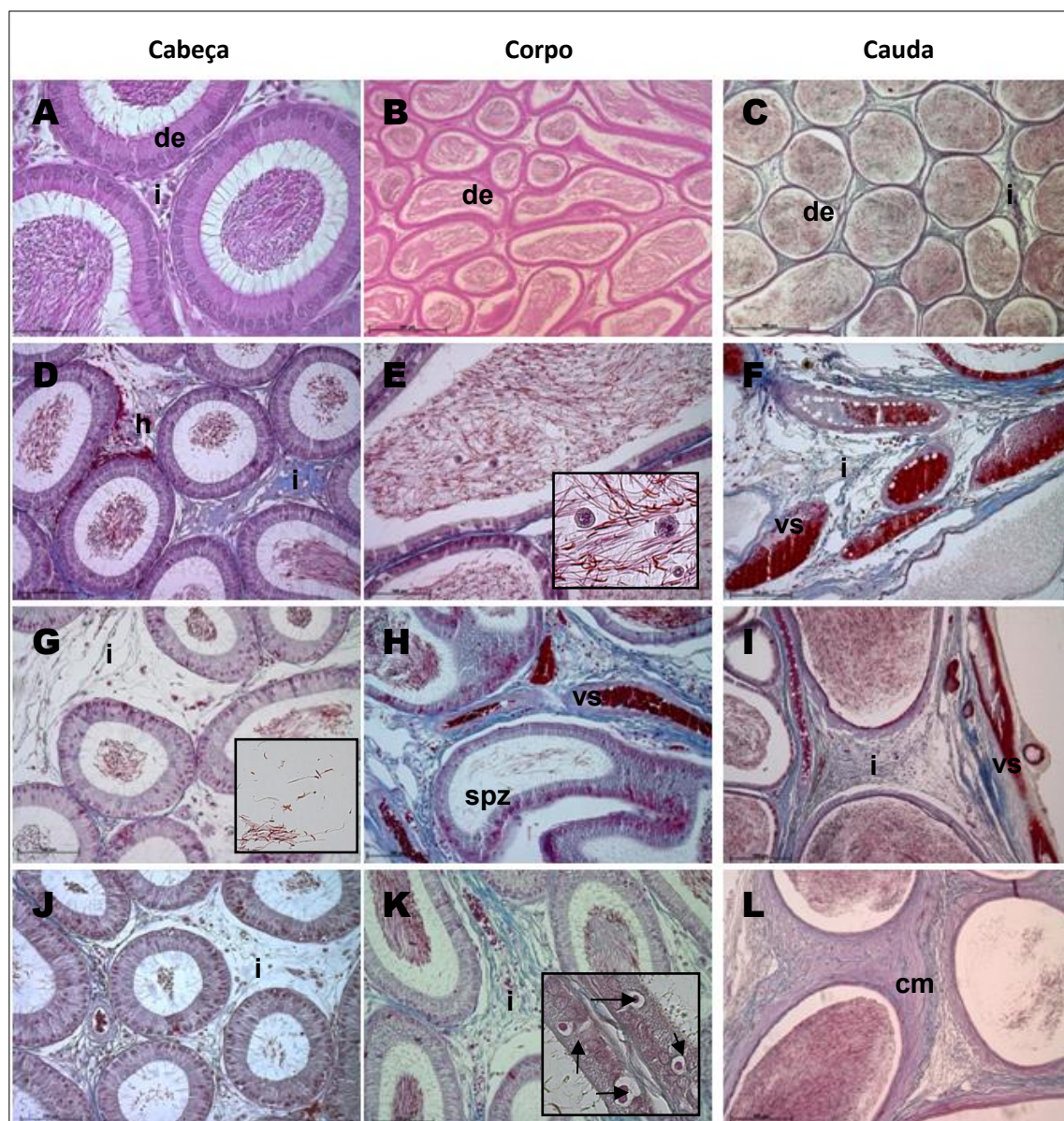


Figura 3.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados permitiram concluir que:

- O consumo de água e ração foi afetado pelo tratamento com o fitoterápico nas doses de 20 e 400mg/kg;
- O peso corpóreo final foi reduzido nos animais tratados com a dose mais alta (400 mg/kg) comparativamente com a dose mais baixa 920 mg/kg);
- As diferentes doses do extrato promoveram alterações histopatológicas nos testículos e epidídimos, concomitantemente a alterações no peso relativo dos epidídimos de C400;
- O tratamento com as diferentes doses de *Cordia ecalyculata* Vell. Promoveu aumento na percentagem de espermatozoides com anomalias flagelares;
- Houve redução na taxa de gestação, peso corpóreo da matriz preta e peso fetal no grupo tratado com 400 mg/kg do extrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

DO TRABALHO

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS DO TRABALHO

ALMEIDA, L.M. Quantificação histológica da espermatogênese de ratos *Wistar* tratados com dimetil sulfoxido (dmso). Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, 1997.

ALMEIDA, L.M.; WEISS, R.R.; CASTRO, C.S.; BÜCHELE, J. Quantificação histológica da espermatogênese de ratos *Wistar* tratados com dimetil sulfoxido. **Archives of Veterinary Science** v.5, p.129-135, 2000.

ALMEIDA, S. A.; KEMPINAS, W. G.; LAMANO CARVALHO, T. L. Sexual behavior and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 1105-1109, 2000.

ANDRADE, B.A., LAFAYETTE, S.S.L. Avaliação toxicológica pré-clínica liófilo de *Cassia occidentalis* L. sobre a fertilidade de ratos *Wistar*. **CONIC**, UFPE, 2008.

ARALDI R.P. & SOUZA E.B. **Análise do potencial mutagênico da *Pholia magra* e da *Spirulina maxima* mediante o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos**. Trabalho de Graduação em Ciências Biológicas – Faculdade de Ciências e Letras de Assis, UNESP, Assis, 2011.

ARREBOLA, M.R.B.; PETERLIN, M.F.; BASTOS, D.H.M.; RODRIGUES, R.F.O.; CARVALHO, P.O. Estudo dos componentes lipídicos das sementes de

três espécies do gênero *Cordia* L. (Boraginaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 57-65, 2004.

ASSONUMA, M.M. Determinação de alantoina e avaliação farmacológica de *Cordia ecalyculata* Vell (Chá de Bugre). Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista. Araraquara-SP, 2009.

BELLO, C.M.; MONTANHA, J.A.; SCHENKEL, E.P. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v.12, n.2, p.75-83, 2002.

BELTRAME, F.L.; MESQUITA, S.F.P.; CAMARGO, I.C.C. Análise histomorfométrica e estereológica de testículos em ratos pré-púberes submetidos ao estresse induzido por imobilização. **Revista Brasileira de zoociências** v.8, n.2, p.139-146, 2006.

CANNISTRA, L. B.; DAVIS, S. M.; BAUMAN, A. G. Valvular hearth disease associated with dexfenfluramine. N. **Engl. J. Med.**, v.337, p.636, 1997.

CAPARROZ-ASSEF S.M.; GRESPAN. R.; BATISTA R.C.F.; BERSANI-AMADO, F. A.; BARONI, S.; DANTAS J.A.; CUMAN R.K.N.; BERSANI-AMADO C.A. Toxicity studies of *Cordia salicifolia* extract. **Acta Sci. Health Sci.**, Maringá, v.27, n.1, p.41-44, 2005.

CARDOZO, S.; DE BONA, L.R.; BARBIZA, L.T.; ANDREOLLA, H.F.; BOECK, R.; VIEIRA, V.; FRANTZ, M.A.; MORISSO, F.D.P.; COITINHO, A.S.; AVARES, R.G. Atividade hipolipidêmica do extrato de *Cordia salicifolia* em camundongos submetidos a dieta hiperlipidêmica. **Revista da AMRIGS.**, v.52, n.3, p.182-186, 2008.

CARVALHO, A.G., GOMES, J.A.L., LEMOS, V.M., OLIVEIRA, T.M.F., FONSECA, B.T.S ESTEVES, A.P.V.S. Consequências fisiopatológicas ao uso de abortificientes durante a gestação. **Revista Portal do Enfermeiro Online**, 2009.

CHIEREGATTO, L.C. Efeito do tratamento crônico com extratos de *Heteropterys aphrodisiaca* O. Mach. E *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. no testículo de ratos *Wistar* adultos. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 2005.

Conselho Federal de Nutricionistas. Disponível em <<http://www.cfn.org.br/novosite/pdf/res/2007/res402.pdf>>. Acesso em: 30 de maio de 2012.

CATERSON, I.D. What should we do about overweight and obesity? **Med. J. Aust.**, v.171, p.599-600, 1999.

CRUZ, G.L. Dicionário das plantas Úteis do Brasil. In PELIZZA, C.P. **Uso de *Cereus sp* e *Cordia ecalyculata* Vell. Como emagrecedores, uma revisão.**

Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

DALLAL, R.M.; CHERNOFF, A.; O'LEARY, M.P.; SMITH, J.A.; BRAVERMAN, J.D.; QUEBBEMANN, B. B. Sexual dysfunction is common in the morbidly obese male and improves after gastric bypass surgery. **J. Am. Coll. Surg.**, v.207(6), p.859-864, 2008.

DAMASCENO, D. C.; KEMPINAS, W. G.; VOLPATO, G. T.; CONSONNI, M.; RUDGE, M. V. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Anomalias Congênitas - Estudos Experimentais. COOPMED, **Ed. Médica**, Belo Horizonte - MG, 1ª ed., p.102, 2008.

D'CRUZ, S.C.; VAITHINATHAN, S.; JUBENDRADASS, R.; MATHUR, P.P. Effects of plants and plant products on the testis. **Asian Journal of Andrology.**, v.12, p.468-479, 2010.

DIAS, T. G. Estudo farmacognóstico de porangaba (*Cordia ecalyculata* Vell. Boraginaceae) e identificação de adulterações. In ASSONUMA, M. M. Determinação de alantoína e avaliação farmacológica de *Cordia ecalyculata* Vell (Chá de Bugre). Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista. Araraquara-SP, 2009.

DIMECH, G.S., GONÇALVES, E.S., ARAÚJO., WANDERLEY, A.G. Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Mentha crisper* sobre a performance reprodutiva em ratos Wistar. **Lat. Am. J. Pharm**, v.26 (2), p.230-7, 2007.

DIRK G. DE ROOIJ. The Spermatogonial Stem Cell Niche. **Microscopy Research and Technique**, v.72, p.580–585, 2009.

ETHUR, L.Z.; JOBIM, J.C.; RITTER, J.G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B.S. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaquí – **RS. Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.2, p.121-128, 2011.

FANGHNEL, G.; CORTINAS, L.; SANCHEZ-REYES, L.; BERBER, A. A. Clinical Trial the use of subramine for the treatment of patients suffering essential obesity. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v.24, n.2, p.144-150, 2000.

FERNANDEZ, C. D. B.; BELLENTANI, F. F.; FERNANDES, G. S. A.; PEROBELLI, J. E.; FAVARETO, A. P. A.; NASCIMENTO, A. F.; CICOGNA, A. C.; KEMPINAS, W. G. Diet- induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.9, p.32, 2011.

FERNANDES, E.S.; PINTO, R.M.; REIS, J.E.P.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M. Effects of Ginkgo biloba extract on the embryo-fetal development in Wistar rats. **Birth Defects Res.(Part B)**, v.89, p.133-138, 2010.

FREITAS, T.L.L.; FOSCHERA, J.A.; SOUZA, G.N.; PUTON, C.F.; RIBEIRO, A. F.; Investigação Medicinal de *Cordia salicifolia*: Relato de experiência no curso de graduação em enfermagem **Revista de Enfermagem**, v.9, n.9, p.70-76, 2013.

FUKUMASU; H.; LATORRE, A.O.; BRACCI, N; GÓRNIAC. S.L.; DAGLI. M.L.Z. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v.21, n.2, p.49-59, 2008.

GADELHA, I.C.N.; RANGELZ, A.H.N.; SILVA, A.R.; BLANCO, B.S. Efeitos do gossipol na reprodução animal. **Acta Veterinaria Brasilica.**, v5.(2), p.129-135, 2011.

GARCIA, P.V. **Análise histológica e estereológica do epidídimo e células de leydig em camundongos submetidos ao criptorquidismo experimental e orquidopexia** - Tese de Doutorado, UNICAMP-SP, 2006.

GOMES, M.L.M. Efeitos da infusão de nó-de-cachorro (*Heteropterys afrodisíaca*. O. Mach) sobre a morfologia e estrutura testicular de ratos *Wistar* adultos submetidos a treinamento físico - Tese de Doutorado, UNICAMP, 2001.

GONZALES, G.F.; RUIZ, A.; GONZALES, C.; VILLEGAS, L.; CORDOVA, A. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats. **Asian Journal of Andrology**, v.3, p.231-233, 2001.

JAMES, W. P.; ASTRUP, A.; FINER, N.; HILSTED, J.; KOPELMAN, P.; ROSSNER, S.; SARIS, W. H.; VAN GAAL, L. F. Effect of sibutramine on weight maintenance after weight loss: a randomized trial. **STORM Study Group. Sibutramine Trial of Obesity Reduction and Maintenance. Lancet**, v 356, n.9248, p.2119-2125, 2000.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. Histologia Básica. 5ª ed, Porto Alegre, **Artmed**, p. 414 a 427, 2010.

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

LAMANO-CARVALHO, T. L.; GUIMARÃES, M. A; KEMPINAS, W. G.; PETENUSCI, S. O.; ROSA E SILVA, A. A. M. Effects of guanethidine-induced sympathectomy on the spermatogenic and steroidogenic testicular functions of prepubertal do mature rats. **Andrologia**, v.28, n.2, p.117-122, 1996.

LAURA, A.L.C. Efeitos da ingestão de extrato hidroacetônico de *Mayatenus ilicifolia* e hidroetanólico de *Achyrocline alata* em ratas prenhes e seus fetos. Tese de Doutorado Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2009.

LIMA, J.M., SILVA, M.L., BLANCO, B.S., SILVIA, C.S. OLORIS, S.C.S. Estudo de toxicidade de extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea pulchra*. **Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**, Natal, agosto, 2012.

LIMA, G.D.A. Fertilidade e morfofisiologia epididimária de ratos *Wistar* submetidos a ingestão de arsenato e arsenito de sódio. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, 2013.

LORENZI, H. Matos FJA Plantas medicinais no Brasil – Nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 1ª ed - pg 98, 2002.

LORENZI, H. Matos FJA Plantas medicinais no Brasil – Nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2ª ed - pg 183, 2008.

LUQUE, C. A.; REY, J. A. Sibutramine: a serotonin-norepinephrine reuptake-inhibitor for the treatment of obesity. **Ann. Pharmacother**, v.33, p. 968-978, 1999.

MATSUNAGA, K.; SASAKI, S.; OHIZUME, Y. Excitatory and inhibitory effects of paraguayian medicinal plants *Equisetum giganteum*, *Acanthospermum australe*,

Allophylus edlis and *Cordia salicifolia* on contraction of rabbit aorta and guinea pig left atrium. **Natural Med**, v. 1, p.478-481, 1997. 12

MAYES, J.S.; WATSON, G. H. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. **Obes. Rev**, v.5(4), p.197-216, 2004

MARK, E. J.; PATALAS, E. D.; CHANG, H. T.; EVANS, R. J.; KESSLER, S. C. Fatal pulmonary hypertension associated with short-term use of fenfluramine and phentermine. **N. Engl. J. Med**, v.337, p.602-606, 1997.

MELLO, F. B.; LANGELOH A.; MELLO, J.R.B. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Passiflora alata*, *Erythrina mulungu*, *Leptolobium elegans* e *Adonis vernalis*. **Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)** **Lat. Am. J. Pharm**, v.26(2) p.191-200, 2007.

MELLO, F.B., LANGELOH, A. MELLO, J.R.B. Estudo de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico contendo *Pimpinella anisum*, *Foeniculum foeniculum*, *Sambucus australis* e *Cassia angustifolia*. **Lat. Am. J. Pharm**, v.26 (2), p.230-7, 2007.

MELLO, J.R.B., MELLO, F.B., ETGES, R.N., HOLLENBACH, C., RODRIGUES, J.M., HIRTZ, L. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Gossypium herbaceum* (Algodoeiro) em Ratos Wistar . **Lat. Am. J. Pharm**, v.27 (1), p.46-55, 2008.

MENDES, T.B.; CAMARGO, I.C.C. Efeito do extrato aquoso de sisal (*Agave sisalana*) sobre parâmetros reprodutivos de ratos adultos: avaliação da histologia e morfometria testicular, morfologia espermática e fertilidade. 2012. Trabalho de Graduação (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências e Letras, UNESP, Assis.

MENGHINI, L.; EPIFANO, F.; LEPORINI, L.; PAGIOTTI, R.; TIRILLINI, B. Phytochemical investigation on leaf extract of *Cordia salicifolia* Cham. In PELIZZA, C.P. Uso de *Cereus sp* e *Cordia ecalyculata* Vell. como emagrecedores, uma revisão. Trabalho de conclusão de curso. UFRS, Porto Alegre, 2010.

OLIVEIRA, F. Q.; GONÇALVES, L.A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de belo horizonte, minas gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Belo Horizonte v.3, n.2, p.36-41, 2006.

OLIVEIRA, R.V.; ARARIPE MOURA, A.A. Epidídimo - Universidade Federal do Ceará programa de doutorado integrado em zootecnia - disciplina tópicos especiais em fisiologia da reprodução e lactação. Aula expositiva em power point. Disponível em: <www.reproducao.ufc.br/epididimo.ppt+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>. Acesso em: 31 de outubro de 2013.

O'RAHILLY. R.; MULLER, F. Embriologia e teratologia humana. 3ªed **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p.289-308, 2005.

PELIZZA, C. P. Uso de *Cereus sp* e *Cordia ecalyculata Vell.* Como emagrecedores, uma revisão. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2010.

PUCCI, L. L.; SANTOS, A.P.; CUNHA, L.C., VALADARES, M. C., PAULA, J. A. M.; PAULA, J. Avaliação da toxicidade aguda método de classes do extrato etanólico de *Rudgea virbunoides* (cham.) benth. (RUBIACEAE). **R.E.F**, v.4 (2), p.72-74, 2007.

RAUBER,C. Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) em ratos Wistar. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

REAGAN-SHAW S., NIHAL M., AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v.22(3), p.659-61, 2008.

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

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

ROTHMAN, R. B.; BAUMAN, M. H. Serotonin releasing agents. Neurochemical, therapeutic and adverse effects. Pharmacol. **Biochem. Behav**, v.71, p.825-836, 2002.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN R.A.; HIKIM, A.P.S; CLEGG E.D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. 1ªed - **Cache River.**, St Louis, MO - Estados unidos, 1990

SAITO, M. L.; OLIVEIRA, F. Morfodiagnose e Identificação Cromatográfica em Camada Delgada de Chá de Bugre – *Cordia ecalyculata* Vell. **Rev. Bras. Farm.**, v.67, p.1-16, 1986.

SANTOS, L.D. Efeito da exposição perinatal ao herbicida glifosato-roundup na diferenciação sexual e endocrinologia reprodutiva. Dissertação de Mestrado - UNICENTRO, 2011.

SILVA, C. J.; BASTOS, J. K.; TAKAHASHI, C. S. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. **J. Ethnopharmacol.**, v.127, p.445-450, 2010.

SILVA, A.T.C. Efeito do zinco isolado ou associado à vitamina e sobre testículos de ratos *Wistar* adultos, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural), 2011.

SIQUEIRA, V. L. D.; CORTEZ, D. A. G.; OLIVEIRA, C. E.; NAKAMURA, C. V.; BAZOTTE, R. B. Pharmacological studies of *Cordia salicifolia* Cham in normal and diabetic rats. Braz. **Arch. Biol. Technol.**, v.49, n.2, p.215-218, 2006.

SOUZA, C. A.; CARDOSO, L. F.; SILVEIRA, R. A.; WITTKOPF, P. G. Importância do exercício físico no tratamento da disfunção erétil. **Rev. Bras. Cardiol.**, v. 24(3), p. 180-185, 2011.

Sociedade Brasileira de Hepatologia. Disponível em <<http://www.sbhepatologia.org.br/fasciculos/25.pdf>>. Acesso em: 17 de maio de 2012.

TEIXEIRA, L.T.A.; JÚNIOR, L.S.S.; QUEIROZ, F.M.O.C.N.; SCHWARZ, A. Avaliação de efeitos toxicológicos e comportamentais da *Hypericum perforatum* e da *Piper methysticum* em ratos **Revista Brasileira de Toxicologia.**, v.22, n.1-2 p.42-49, 2009.

TOTSUGUI, J. T.; ADRATT, E.; MANDELLI NETO, J.; ODASHIRO, A. N. **Manual pratico de patologia do aparelho reprodutor masculino – Disciplina de patologia PUC – Curitiba, PR.** Disponível em

.pucpr.br/saude/temp/laboratorios/patologia/docs/LPE_reprod_masc.doc
&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br. Acesso em 3 de setembro de 2013

TUROLLA, M. S.R. **Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo.** Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

WHEATER; BURKITT; DANIELS. Histologia funcional. 1ªed **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro p. 243-253, 1982.

ANEXO I

Registro CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências e Letras de Assis
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Projeto "*Avaliação do potencial tóxico reprodutivo do extrato seco hidroetanólico de Cordia ecaluculata Vell, em diferentes doses, administrado em ratos Wistar*", Registro nº 009/2012, sob responsabilidade do(a) Pesquisador(a) **Mirian Campos dos Santos**, conforme registrado, atende à legislação vigente no que tange o respeito aos princípios éticos na experimentação animal.

CERTIFICAMOS, ainda, que o referido projeto será desenvolvido em 18 meses, no período de dezembro/2012 a junho/2014, e os Relatórios deverão ser entregues em Setembro/2013 e Junho/2014.

Assis, 14 de dezembro de 2012.


Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

ANEXO II

Normas da Revista *Phytotherapy Research*

Phytotherapy Research - Author Guidelines

NIH Public Access Mandate

For those interested in the Wiley Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, please visit our policy statement

For additional tools visit Author Resources - an enhanced suite of online tools for Wiley Online Library journal authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.

Permission Request Form

Phytotherapy Research is a monthly, international journal for the publication of original research papers, short communications, reviews and letters on medicinal plant research. Key areas of interest are pharmacology, toxicology, and the clinical applications of herbs and natural products in medicine, from case histories to full clinical trials, including studies of herb-drug interactions and other aspects of the

safety of herbal medicines. Papers concerned with the effects of common food ingredients and standardised plant extracts, including commercial products, are particularly welcome, as are mechanistic studies on isolated natural products.

Short communications dealing with the pharmacology and screening of crude or uncharacterised extracts will be considered for publication only if they are clearly of interest to our international readership and are not deemed more suitable for a regional audience.

Phytotherapy Research does not publish agricultural, phytochemical, structure elucidation, quality control or botanical identification papers unless directly pertinent to the pharmacological effects or overall safety of plant based medicines currently in use.

- **Manuscript Submission.** *Phytotherapy Research* operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then click <http://mc.manuscriptcentral.com/ptr> to navigate to the *Phytotherapy Research* online submission site.
- **All papers must be submitted via the online system.**

- Authors are welcome to submit the names and contact details of up to three suggested reviewers, using the online system. Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time.
- **File types.** Preferred formats for the text and tables of your manuscript are *.doc, *.docx and *.rtf. Figures must be provided in *.tiff or *.eps format.
- **Upon acceptance**, authors must supply by e-mail to the Production Editor: permission grants, quoting the manuscript code. If the manuscript contains extracts, including illustrations, from other copyright works (including material from on-line or intranet sources) it is the author's responsibility to obtain written permission from the owners of the publishing rights to reproduce such extracts using the Wiley Permission Request Form.
- **Manuscript Style.** The language of the journal is English. Please ensure that your manuscript has been checked by an English language expert if there is concern for grammatical or other errors. All submissions including book reviews must have a title, be double-line spaced with type no smaller than 12 point, and have a margin of 3cm all round. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate Image files.
- **The title** page must list the full title, short title of up to 60 characters and names and affiliations of all authors. Give the full address, including email, telephone and fax, of the author who is to check the proofs.
- Include the name(s) of any sponsor(s) of the research contained in the paper, along with grant number(s).
- Supply an **abstract** of up to 200 words for all articles. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work.
- Include up to six **keywords** that describe your paper for indexing purposes.
- Authors may suggest up to 3 potential reviewers
- A concise **introduction** is required of the background to the subject, its significance and its relationship to earlier works, with references.
- **Materials and methods** should be presented with clarity and detail. State the original and important findings in the results. Illustrate these with figures or tables where necessary but keep these to a minimum.

- **Results and discussion** may be combined as one section. Discuss the principal conclusions drawn from the results and their important implications.
- **Convention on biodiversity.** Authors must indicate that they have obtained authority to access plant samples (other than freely available commercial crops or herbal products) used for research and that this has been authorised by the appropriate agent of the government of the source country as required under the framework of the United Nations Convention on Biodiversity.
- **Botanical aspects.** Plant materials used must be adequately described using the Latin binomial for the plant, author of the name, plant family, source (e.g. country and region of collection, name of the collector and collection number) means of unambiguous identification (e.g. name and affiliation of expert botanist or the results of comparison with a published monograph and/or authenticated reference specimen). The reference number and place of deposition of a voucher specimen of the plant material must be given. For papers relating to crude plant extracts, the method of extraction and the yield of dried extract as a percentage weight of the starting fresh or dried plant material must also be stated. These should be submitted as short communications (see below).
- **Experimental procedures.** Bioassay data for plant extracts or isolated compounds must be accompanied by data for positive and negative controls. All animal experiments should be conducted in accordance with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and associated guidelines, the EEC Directive of 1986 (86/609/EEC) or the NIH guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publication No. 80-23; revised 1978). The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal procedures used.
- Use Chemical Abstracts nomenclature for chemical names and structures. Use proper or proprietary names with caution. Common acronyms for biomedical names are acceptable but define all others when first mentioned. Define abbreviations when first mentioned and do not use in the title or abstract. Define non-standard units.
- Keep acknowledgements brief and place them at the end of the paper.

Original Papers. These should not exceed five printed pages including a maximum of four figures and/or four tables and 30 references, (where one page comprises 800 words or the equivalent in illustrative and tabular material).

Short Communications. These must be complete, self-contained papers, and not preliminary reports. These should not exceed two printed pages including a maximum of two figures and/or two tables and 10 references. To exceed the limit may delay acceptance or publication of the paper.

Reviews and Keynote Lecture Transcripts. These will usually be written at the invitation of the Editors. Unsolicited reviews and manuscripts based on Conference Keynote Lectures will be welcome but authors wishing to submit these are requested to consult the Editor beforehand, ideally prior to commencement of writing. Reviews should include a Table of Contents and will normally be limited to 10,000 words including references and should be submitted via the online system.

Correspondence. Items submitted for the correspondence columns, which need have no fixed format are intended for constructive comments on published work or for putting forward new ideas and are published at the discretion of the Editors.

Pre-Submission English Language Editing Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals.editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Reference style. References should be quoted in the text as name and year, and listed at the end of the paper alphabetically. All references must be complete and accurate. Phytotherapy Research uses Index Medicus Style abbreviations for journals cited. For correct abbreviations visit <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7251/#IX-E>. If necessary, cite unpublished or personal work in the text but do not include it in the reference list. References should be listed in the following style: Journals: Wright CW, Phillipson JD. 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* 4: 127-139.

Books: Wagner H, Bladt S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* (2nd edn).

Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Chapters in Books: Kips RH. 1985. Environmental aspects. In *Pesticide Application: Principles and Practice*, Haskel PT (ed). Oxford University Press: Oxford; 1-34.

Illustrations. Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, with the lead author's name, the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Please supply artwork at the intended size for printing, sized to the text width of 84mm/single column,

76mm/double column. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

- Black and white and colour photos - 300 dpi
- Graphs, drawings, etc. - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum
- Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi

The cost of printing colour illustrations in the journal will be charged to the author. If colour illustrations are supplied electronically in either TIFF or EPS format, they may be used in the PDF of the article at no cost to the author, even if this illustration was printed in black and white in the journal. The PDF will appear on the Wiley Online Library site.

OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication.

Copyright Transfer Agreement. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement. If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions

For authors choosing OnlineOpen. If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services and Visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Further Information. Proofs will be sent to the author for checking. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimise the risk of the paper being held over to a later issue. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only (unless otherwise stated). Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Reprints of your article and copies of the journal may be ordered. There is no page charge to authors.

Authors Resources: Manuscript now accepted for publication?

If so, check out our suite of tools and services for authors and sign up for:

- Article Tracking E-mail Publication Alerts
- Personalization Tool PEER Project

This journal is participating in the PEER Project, an EU-funded initiative to examine the impact on scholarly journals of depositing accepted manuscripts in web-based repositories. If the corresponding author is based in an EU country, we will deposit the accepted manuscript into a central project repository (DRIVER). The article's availability will be subject to a post-publication embargo. This project has no effect on your rights or obligations under the terms of the copyright agreement pertaining to this journal.

Conflict of Interest. All authors must declare financial/commercial conflicts of interest. Even if there is none, this should be stated in a separate paragraph following on from the Acknowledgements section. This is a mandatory requirement for all articles.

Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1099-1573/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1099-1573/homepage/ForAuthors.html)> Acesso em: 30 de outubro de 2013.