

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

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE FITOTERÁPICO CONTENDO *Glycine max*
(L.) Merr DURANTE O PERÍODO DE ORGANOGÊNESE EM RATAS WISTAR**

Carlos Eduardo Bortolini

Orientação: Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello

PORTO ALEGRE

Fevereiro de 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE FITOTERÁPICO CONTENDO *Glycine max*
(L.) Merr DURANTE O PERÍODO DE ORGANOGÊNESE EM RATAS WISTAR**

Carlos Eduardo Bortolini

Orientação: Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello

PORTO ALEGRE

Fevereiro de 2009

Carlos Eduardo Bortolini

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE UM FITOTERÁPICA CONTENDO *Glycine max* (L.) Merr DURANTE O PERÍODO DE ORGANOGÊNESE EM RATAS WISTAR.

Aprovada em 04 de março de 2009.

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. Augusto Langeloh,
Membro da Comissão

Prof. Dra. Fernanda Bastos de Mello,
Membro da Comissão

Prof. Dr. Geraldo Jotz,
Membro da Comissão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Considerações históricas.....	13
2.2 Fitoterapia.....	14
2.3 Fitoestrógenos.....	15
2.4 Isoflavonas.....	16
2.5 Farmacocinética.....	16
2.6 Mecanismo de ação.....	18
2.7 Efeitos farmacológicos e indicações.....	18
2.8 Efeitos adversos.....	21
2.9 Avaliação da toxicidade reprodutiva.....	23
2.10 Uso de medicação durante a gestação.....	25
2.11 Teste de toxicidade pré-natal.....	27
2.12 Teratogenicidade relacionada aos fitoestrógenos.....	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Animais.....	32
4.2 Preparação fitoterápica.....	32
4.3 Tratamento.....	33
4.4 Procedimentos.....	33
4.4.1 Avaliação do ciclo estral, acasalamento e diagnóstico de gestação.....	34
4.4.2 Laparotomia e desempenho reprodutivo materno aos 21 dias de gestação.....	34
4.4.3 Avaliação dos fetos aos 21 dias e gestação.....	36
4.4.4 Avaliação das alterações esqueléticas.....	36
4.5 Variáveis avaliadas.....	40
4.6 Análise estatística.....	41

5 RESULTADOS	42
5.1 Avaliação da toxicidade materna.....	42
5.1.1 Ganho relativo de massa corporal.....	42
5.1.2 Consumo de ração.....	43
5.1.3 Ingestão hídrica.....	45
5.1.4 Sinais de toxicidade materna.....	46
5.1.5 Perdas embrionárias pós-implantação.....	48
5.2 Avaliação da embriofetotoxicidade.....	51
5.2.1 Avaliação dos fetos.....	51
5.2.2 Alterações macroscópicas externas.....	53
5.2.3 Alterações esqueléticas.....	54
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS.....	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Ocorrência de anomalias ósseas nos fetos (%) por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6^o ao 15^o dia de gestação. Os valores representam a percentagem dos grupos.....55

TABELA 2. Ocorrência de retardos de ossificação e malformações dos ossos da cabeça por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6^o ao 15^o dia de gestação.....57

TABELA 3. Ocorrência de alterações na região cervical, tórax, região lombar e pelve, dos fetos por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6^o ao 15^o dia de gestação.....58

TABELA 4. Ocorrência de malformações, variações e retardos de ossificação dos ossos dos membros torácicos e pélvicos, dos fetos por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6^o ao 15^o dia de gestação.....62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo reprodutivo de mamíferos (LEMONICA, 2008).....24
- Figura 2. Resultados finais da exposição materna aos agentes químicos durante o período de gestação (LEMONICA, 2008).....26
- Figura 3. Períodos de tratamento em testes de toxicidade reprodutiva em ratos (LEMONICA, 2008).....28
- Figura 4. Períodos do desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato (BERNARDI, 1999).....29
- Figura 5. Bandejas com os filhotes de ratas tratadas entre o 6° e o 15° dias de gestação, corados com vermelho de alizarina e clarificados com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985).....38
- Figura 6. Feto de uma rata do grupo GS3, tratada entre o 6° e o 15° dias de gestação, com uma formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®), corado com vermelho de alizarina e clarificado com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985), preparado para a análise esquelética.....39
- Figura 7. Desenvolvimento ponderal das ratas (1° dia = 100%) tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 12) durante o período gestacional.....43
- Figura 8. Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal durante a gestação de fêmeas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 12).....44
- Figura 9. Consumo percentual de água (%) das ratas em relação à massa corporal durante a gestação de fêmeas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 12).....46
- Figura 10. Útero gravídico de uma rata Wistar do grupo GS2, visualizado logo após a laparotomia, evidenciando petéquias na parede uterina. As setas indicam as alterações macroscópicas encontradas logo após a laparotomia.....47
- Figura 11. Média do peso das ninhadas por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®) com três diferentes doses (GS1,

GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam as médias dos grupos (n = 12). S = desvio padrão.....48

Figura 12. Média do número de implantes uterinos por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam as médias dos grupos (n = 12). S = desvio padrão.....49

Figura 13. Média de fetos vivos das ninhadas por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam as médias dos grupos (n = 12). S = desvio padrão.....50

Figura 14. Percentual das perdas pós-implantação por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam as médias dos grupos (n = 12). S = desvio padrão.....51

Figura 15. Útero gravídico de uma rata Wistar do grupo GS2. A seta indica a presença de um ponto de implante uterino com ausência de feto.....52

Figura 16. Média da massa corporal individual dos filhotes por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam as médias dos grupos (n = 12). S = desvio padrão. * = diferença estatística significativa em relação aos demais grupos (p<0,05).....53

Figura 17. Filhotes de uma rata Wistar do grupo GS3. A seta indica a presença de hematomas cutâneos.....54

Figura 18. Fusão entre os ossos: pré-maxilar e zigomático, de um feto do grupo GC+, corados com vermelho de alizarina e clarificados com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985). A seta indica o ponto de fusão entre as duas estruturas ósseas.....56

Figura 19. Centro esternal no formato bipartido de um feto do grupo GS2, corado com vermelho de alizarina e clarificado com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985). A seta indica a alteração do formato.....59

Figura 20. 14° par de costelas rudimentar e centro de vértebras torácicas e lombares no formato bipartido, de um feto do grupo GS3, corado com vermelho de alizarina e clarificado com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985). As setas indicam as alterações.....60

Figura 21. Ossificação incompleta das falanges do membro torácico de um feto do grupo GS2, corado com vermelho de alizarina e clarificado com o método de coloração adaptado

por Taylor & Van Dyke (1985). As setas indicam a ossificação incompleta das falanges.....61

RESUMO

A isoflavona é uma substância natural, com atividade estrogênica, amplamente distribuída no reino vegetal. As concentrações destes compostos são relativamente maiores nas leguminosas e, em particular, na soja (*Glycine max*). Sendo que as principais isoflavonas encontradas na soja e seus derivados são a genisteína, a daidzeína e a gliciteína.

A soja e seus constituintes são consumidos em níveis elevados por várias populações asiáticas há séculos, sem qualquer efeito adverso aparente. Porém, a preocupação levantada a partir dos potenciais efeitos adversos da atividade estrogênica das isoflavonas, requer diversos estudos de segurança com o uso das preparações fitoterápicas contendo soja, *Glycine max* (L.) Merr.

O presente trabalho avaliou os efeitos da administração de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr., durante o período de organogênese em ratas Wistar. As ratas foram tratadas, por via oral durante o 6° ao 15° dia de gestação. Os grupos estudados receberam: 1,72 mg/kg/dia (GS1); 8,60 mg/Kg/dia (GS2) e 17,20 mg/kg/dia (GS3) da uma formulação fitoterápica (Soyfeme[®]), o grupo controle negativo (GC-) o veículo (água destilada) e o grupo controle positivo (GC+) 4,27 mg/kg de isoflavonas (aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína).

Foi avaliada a toxicidade materna e a embriofetotoxicidade. Os resultados revelaram toxicidade materna mínima. Na avaliação do consumo diário de ração das progenitoras foi evidenciando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no consumo de ração no 21° dia de gestação: GC+ (7,42g \pm 1,01), GS1 (7,40g \pm 0,94), GS2 (7,44g \pm 1,49) e GS3 (7,48g \pm 1,25), quando comparados ao GC- (6,46g \pm 1,85). No entanto, a mesma diferença não foi identificada na avaliação do ganho relativo de massa corporal materna ($p > 0,05$). Porém, na avaliação do peso corporal individual dos filhotes o grupo GS3 (4,81 \pm 0,41) demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação aos demais grupos: GC- (5,18 \pm 0,44); GC+ (5,13 \pm 0,54); GS1 (5,00 \pm 0,43); GS2 (5,07 \pm 0,67).

As progenitoras também apresentaram alteração macroscópica na parede uterina representadas como petéquias: GC- (0/12); GC+ (0/12); GS1 (0/12); GS2 (7/12) e GS3 (9/12), evidenciando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os filhotes expostos à formulação comercial e à mistura de isoflavona demonstraram alterações macroscópicas

externas através de hematomas cutâneos os quais não ocorreram na mesma proporção ($p < 0,05$) entre os grupos: GC- (0/122), GC+ (23/117), GS1 (23/121), GS2 (20/109), GS3 (40/121), maior ocorrência de variantes esqueléticas evidenciando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$): GC- (15,57/122), GC+ (18,80/117), GS1 (35,53/121), GS2 (37,61/109), GS3 (42,14/121) e retardo no desenvolvimento de centros de ossificação evidenciando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles: GC- (15,57/122), GC+ (18,80/117), GS1 (35,53/121), GS2 (37,61/109), GS3 (42,14/121).

Desta forma, sugere-se que esta formulação fitoterápica, contendo *Glycine max* (L.) Merr., pode alterar a gestação das fêmeas tratadas; entretanto, não apresenta potencial para má-formações ósseas até 17,20 mg/kg/dia, em ratos Wistar.

ABSTRACT

Isoflavone is a natural substance, with estrogenic activity, widely distributed in the vegetable kingdom. The concentrations of these compositions are relatively higher in the leguminous plants and, mainly, in soy (Glycine max). The main isoflavones found in soy and its derivatives are genistein, daidzein, and glycitein. Soya and its constituents have been consumed at high levels by several Asian populations for centuries, without any apparent adverse effects. However, the preoccupation that emerged due to potential adverse effects of this estrogenic activity of the isoflavones requires several safety studies with the use of phytotherapeutic preparations containing soy, Glycine max (L.) Merr. The present study evaluated the effects of the administration of a phytotherapeutic formulation containing Glycine max (L.) Merr., during the organogenesis period in Wistar rats. The rats were treated, orally, from the 6th to the 15th day of gestation. The groups studied received: 1.72 mg/kg/day (GS1); 8.60 mg/Kg/day (GS2) and 17.20 mg/kg/day (GS3) of a phytotherapeutic formulation (Soyfeme[®]), the negative control group (GC-) the vehicle (distilled water) and positive control group (GC+) 4.27 mg/kg of isoflavones (approximately 45% of genistein, 23% of daidzein, and 4% of glycitein). The maternal toxicity and the embryo/fetotoxicity were evaluated. The results showed minimal maternal toxicity. In the evaluation of the daily consumption of ration of the progenitors, a statistically significant difference ($p < 0.05$) in the consumption of the ration on the 21st day of gestation was showed: GC+ (7.42g \pm 1.01), GS1 (7.40g \pm 0.94), GS2 (7.44g \pm 1.49) and GS3 (7.48g \pm 1,25), when compared to GC- (6.46g \pm 1.85). However, the same difference was not identified in the evaluation of the relative gain of maternal body mass ($p > 0.05$). However, in the evaluation of the individual body weight of the pups, the group GS3 (4.81 \pm 0.41) showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) in relation to the other groups: GC- (5.18 \pm 0.44); GC+ (5.13 \pm 0.54); GS1 (5.00 \pm 0.43); GS2 (5.07 \pm 0.67). The progenitors also showed macroscopic alteration on the uterine walls represented as petechiae: GC- (0/12); GC+ (0/12); GS1 (0/12); GS2 (7/12) and GS3 (9/12), evidencing a statistically significant difference ($p < 0.05$). The pups exposed to the commercial formulation and the mix of isoflavones showed external macroscopic alterations, cutaneous hematomas, which did not occur in the same proportion ($p < 0.05$) among the groups: GC- (0/122), GC+ (23/117),

*GS1 (23/121), GS2 (20/109), GS3 (40/121), a greater occurrence rate of skeletal variants evidencing a statistically significant difference ($p < 0.05$): GC- (15.57/122), GC+ (18.80/117), GS1 (35.53/121), GS2 (37.61/109), GS3 (42,14/121) and retardation in the development of the ossification centers, evidencing a statistically significant difference ($p < 0.05$) in relation to the control groups: GC- (15.57/122), GC+ (18.80/117), GS1 (35.53/121), GS2 (37.61/109), GS3 (42.14/121). This way, it is suggested that this phytotherapeutic formulation containing *Glycine max (L.) Merr.* can alter the gestation of the females treated; however, it does not have any potential for bone malformation at a dose of up to 17.20 mg/kg/day, in Wistar rats.*

1. INTRODUÇÃO

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais (SIMÕES et al., 2001). No século passado, os fármacos de origem sintética passaram a predominar no arsenal terapêutico. Concomitantemente, as preparações de origem vegetal começaram a ter menor importância e crédito pela classe médica devido não serem produzidos de formas padronizadas, e conseqüentemente não produziam o efeito terapêutico desejado (ALVES & SILVA, 2002).

Com a valorização de hábitos mais saudáveis como o consumo de alimentos naturais, a evidência de efeitos colaterais de medicamentos sintéticos, comprovação científica da atividade farmacológica dos fitoterápicos e o preço destes que, de maneira geral, tem sido mais acessível à população de menor renda, o consumo tem crescido no mercado mundial (SOUSA & MIRANDA, 2008).

Fitoterapia é o estudo das plantas medicinais e suas aplicações na cura das doenças. A palavra fitoterapia vem de dois radicais gregos: fito (*Phyton*), que significa planta e terapia (*Therapeia*), que significa tratamento ou prevenção de doenças (ALVES & SILVA, 2002).

Nos últimos anos, têm-se atribuído que os constituintes de plantas com uma estrutura fenólica similar aos estrogênios, conhecidos como fitoestrógenos, seriam alternativas naturais, para a reposição hormonal (CLAPAUCH et al., 2002). Exemplo disso, a leguminosa oleaginosa soja.

Cultivada pelos chineses há cinco mil anos, a soja chega ao terceiro milênio como uma das mais importantes “*commodities*” agrícolas do mercado e ainda estão sendo reconhecidos seus efeitos terapêuticos e efeitos colaterais. Isso significa que a soja e seus derivados podem colaborar na melhoria da saúde e na qualidade de vida (EMBRAPA, 2004a).

A soja e seus constituintes foram consumidos em níveis elevados por várias populações asiáticas durante séculos, sem qualquer aparente efeito adverso. Porém a preocupação levantada a partir dos potenciais efeitos adversos da atividade estrogênica das isoflavonas, sugere diversos estudos de segurança com o uso das preparações fitoterápicas contendo soja, *Glycine max* (L.) Merr (McCLAIN et al., 2006).

O maior interesse dos pesquisadores é na farmacologia e fisiologia das isoflavonas, pois podem apresentar estruturas não esteroidal e comportam-se como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, além de serem as mais abundante dentre os fitoestrógenos (ESTEVES & MONTEIRO, 2001).

Nos últimos anos, vários estudos evidenciam os benefícios da soja na prevenção de doenças crônico-degenerativas, graças à sua composição, a concentração e as características de isoflavonas na soja; compostos biologicamente ativos e que possuem funções terapêuticas. A soja pode ser benéfica na terapêutica de algumas doenças, nas quais haja dependência de hormônios como o câncer de mama, a menopausa e a osteoporose (EMBRAPA, 2004b).

Apesar do avanço das pesquisas nestas últimas décadas, apenas 30 a 35% das causas das malformações podem ser esclarecidas, em face da grande dificuldade de se recuperar a história do paciente e também do fato de a grande maioria dos casos de malformações estar relacionada a vários fatores intercorrentes (LEMONICA, 2008).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de uma formulação fitoterápica comercial sobre o desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese (*Segmento II*: de toxicidade pré – natal) de ratos Wistar, contribuído para o entendimento da atuação dos fitoestrogênios provenientes da soja, *Glycine max* (L.) Merr, sobre a fase de embriogênese na gestação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações Históricas

A partir de sua origem no norte da China, a soja se expandiu de maneira lenta, entre 200 A.C. e o século III D.C., para o sul da China, Coréia, Japão e sudeste da Ásia. Por séculos, a cultura permaneceu restrita ao oriente sendo introduzida no ocidente, pela Europa, somente por volta do século XV; não com finalidade de alimentação, como acontecia na China e Japão, mas de ornamentação, como na Inglaterra, França e Alemanha (EMBRAPA, 2004a).

Mais de quinhentos anos passaram-se até que a civilização ocidental percebesse o valor do grão de soja na alimentação, principalmente o seu valor protéico. As primeiras tentativas de produção de soja na Europa fracassaram, provavelmente, devido a fatores climáticos, ausência de conhecimento sobre a cultura e suas exigências. Os norte-americanos foram os que, entre o fim do século XIX e início do século XX, conseguiram desenvolver o cultivo comercial da soja, criando novas variedades, com teor de óleo mais elevado. A partir de então, ocorreu a expansão do seu cultivo (EMBRAPA, 2004a).

A introdução da soja no Brasil deu-se por volta de 1882, com o professor Gustavo Dutra, da Escola de Agronomia da Bahia, realizando os primeiros estudos com a cultura no país. Cerca de dez anos depois, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), no Estado de São Paulo, também iniciou estudos para obtenção de cultivares aptos à região. Naquela época, porém, o interesse pela cultura não era pelo seu material nobre, o grão, e sim mais pela planta como uma espécie a ser utilizada como forrageira e na rotação de culturas. Os grãos eram oferecidos aos animais uma vez que ainda não havia o seu emprego na indústria (EMBRAPA, 2004a).

O primeiro registro de cultivo comercial de soja no Brasil data de 1914, no município de Santa Rosa, RS. Mas, foi somente a partir dos anos 40 que o seu cultivo adquiriu alguma importância econômica, merecendo o primeiro registro estatístico nacional, em 1941, no Anuário Agrícola do Rio Grande do Sul, onde se lê: área cultivada de 640 ha, produção de 450 t. Nesse mesmo ano, instalou-se a primeira indústria processadora de soja do país, em Santa Rosa, RS. E em 1949, com produção de 25.000 t, o

Brasil figurou, pela primeira vez, como produtor de soja nas estatísticas internacionais (EMBRAPA, 2004a).

Atualmente, a soja e seus derivados apresentam grande potencial no mercado de alimentos funcionais devido à presença de compostos bioativos, como as isoflavonas, as quais tem sido largamente estudadas quanto aos seus efeitos biológicos benéficos à saúde, tais como: atividade estrogênica, antiestrogênica, hipocolesterêmica e anticarcinogênica (BARBOSA et al., 2006).

2.2 Fitoterapia

A Fitoterapia (do grego *therapeia* = tratamento e *phyton* = vegetal) é o estudo das plantas medicinais e suas aplicações na cura das doenças. Ela surgiu, independentemente (a espécie já existente no país, de forma selvagem, passou a ser cultivada), na maioria dos povos. Na China, surgiu por volta 3000 A. C. quando o imperador Cho-Chin-Kei descreveu as propriedades do Ginseng e da Cânfora. As bases da fitoterapia repousam no conhecimento popular de plantas utilizadas na vida diária (SIMÕES et al., 2001).

Há uma grande quantidade de plantas medicinais, em todas as partes do mundo, utilizadas há milhares de anos para o tratamento de doenças, através de mecanismos na maioria das vezes desconhecidos. O estudo desses mecanismos e o isolamento do princípio ativo (a substância ou conjunto delas que é responsável pelos efeitos terapêuticos) da planta é uma das principais prioridades da farmacologia (SIMÕES et al., 2001).

Enquanto o princípio ativo não é isolado, as plantas medicinais são utilizadas de forma caseira, principalmente através de chás. Ou de forma industrializada, com extrato homogêneo da planta. Ao contrário da crença popular, o uso de plantas medicinais não é isento de risco. Além disso, todo princípio ativo terapêutico é benéfico dentro de um intervalo de quantidade. Abaixo dessa quantidade é inócuo e acima disso passa a ser tóxico (SIMÕES et al., 2001).

À medida que os princípios ativos são descobertos, eles são isolados e refinados de modo a eliminar agentes tóxicos e contaminações. As doses terapêuticas e tóxicas são bem estabelecidas, determinando de forma precisa a faixa terapêutica e as interações desse fármaco com os demais (SIMÕES et al., 2001).

Considera-se também que grande número de plantas medicinais não contém um princípio ativo específico e suas propriedades terapêuticas derivariam da totalidade de seus ingredientes. Inúmeros medicamentos têm princípios ativos extraídos de plantas, sendo modificados quimicamente em laboratório para potencializar a atividade, aumentando a biodisponibilidade ou diminuir os efeitos adversos (CLAPAUCH et al., 2002).

2.3 Fitoestrógenos

Nas últimas décadas, tem havido um grande interesse nos fitoestrógenos e em particular nos potenciais benéficos que uma dieta rica nestes compostos pode conferir no controle de muitas doenças crônicas (ESTEVES & MONTEIRO, 2001). Os fitoestrógenos são compostos naturais encontrados nas plantas, geralmente apresentando um anel fenólico em sua estrutura. Produzem efeitos como do hormônio estrogênico em animais e humanos (ALVES & SILVA, 2002; KNIGHT & ÉDEN, 1995; MUELLER, 2002).

O primeiro grupo de hormônios vegetais detectados foi o das auxinas, sendo de grande importância na botânica, por seus efeitos no controle de muitos processos metabólicos (CLAPAUCH et al., 2002).

Essa descoberta é o resultado de experiências feitas por diversos fisiologistas, a se iniciar por Darwin. A atividade estrogênica das plantas foi primeiramente demonstrada em 1926, e em meados da década de 70 já se tinha demonstrado que centenas de plantas exibiam atividade estrogênica (ALVES & SILVA, 2002).

A partir da década de 1940, os fitoestrógenos assumiram um papel biológico e econômico importante com a verificação de infertilidade em massa de ovelhas australianas que ingeriram alta quantidade de trevo vermelho, o que provocou a chamada doença do trevo (*clover disease*) (ALVES & SILVA, 2002).

Os fitoestrógenos mais encontrados nas dietas são as isoflavonas, presentes principalmente em produtos à base de soja (LIGGINS et al., 2000). As isoflavonas, por sua semelhança estrutural ao estrógeno humano, determinam efeitos estrogênicos importantes, sendo por isso referidos como fitoestrógenos (WANG & MURPHY, 1994). Os principais fitoestrógenos são os encontrados na soja (CLAPAUCH et al., 2002).

2.4 Isoflavonas

As isoflavonas, também denominadas isoflavonóides, são compostos químicos fenólicos, pertencentes à classe dos fitoestrógenos e estão amplamente distribuídos no reino vegetal. As concentrações destes compostos são relativamente maiores nas leguminosas e, em particular, na soja (*Glycine max*). Sendo que as principais isoflavonas encontradas na soja e seus derivados são a daidzeína, a genisteína e a gliciteína, as quais apresentam-se como várias formas de conjugados glicosídicos, dependendo da extensão do processamento ou fermentação.

Do total de isoflavonas, dois terços são de glicosídeos conjugados de genisteína, sendo, o restante composto de conjugados de daidzeína e pequenas quantidades de gliciteína. Já nos produtos fermentados de soja, predominam não só a genisteína, mas também a daidzeína, devido à ação de glicosidases bacterianas (SETCHELL, 1998).

2.5 Farmacocinética

As isoflavonas estão presentes nos alimentos ligadas a açúcares e beta-glicosídeos. Nesta forma não são absorvidos pelo organismo humano. Somente as isoflavonas livres sem a molécula de açúcar, as chamadas agliconas, são capazes de atravessar a membrana plasmática.

Quando consumidas, são hidrolisadas pelo suco gástrico liberando as agliconas como a daidzeína, genisteína e gliciteína e sendo absorvida diretamente no intestino ou biotransformadas por ação de bactérias glicosidases (TAPIERO et al., 2002). Enzimas hidrolíticas de bactérias intestinais são responsáveis por estas reações. No lúmen, as bactérias convertem grande parte dessas agliconas em equol (produto de degradação bacteriana da daidzeína) ou 4-etilfenol (produto de degradação da genisteína) (TAPIERO et al., 2002).

Todos estes precursores e metabólitos exercem atividade estrogênica. As formas agliconas e os produtos metabólitos das isoflavonas são absorvidos pela barreira epitelial do intestino, a qual ocorre passivamente via micelas. Após a absorção, estas moléculas são incorporadas nos quilomícrons, que as transportam ao sistema linfático antes de entrar no

sistema circulatório. Os quilomícrons distribuem as isoflavonas em todos os tecidos extra-hepáticos, onde irão exercer todos seus efeitos metabólicos.

A retomada das isoflavonas circulantes do sangue ocorre passivamente e todas as células que contêm receptores para estrógenos podem ser influenciadas por essas moléculas. Quando secretados pela bile, parte é reabsorvida pela circulação êntero-hepática; parte é excretada pelas fezes e a outra parte é excretada pela urina (ANDERSON & GARNER, 1997). Contudo, a eliminação urinária das isoflavonas é maior (WANG & MURPHY, 1994; SETCHELL, 1998).

Nos órgãos-alvo, tendem a realizar ligações estáveis com os receptores hormonais. Porém, resulta em uma ação estrogênica fraca. Está característica confere -lhes uma ação reguladora tanto em situações de hiper como de hipoestrogenismo (ALVES & SILVA, 2002).

Embora estudos mostrem que os efeitos estrogênicos sejam pequenos (1/1.000 a 1/100.000 inferior à atividade do estradiol), na presença de estrogênio elas agem como antiestrogênios, competindo com eles nos sítios de ligação nos receptores de estrógenos presentes nas células. Na ausência de estrógenos, essas substâncias apresentam efeito estrogênico (QUEIROZ, 2004).

As isoflavonas apresentam ligação preferencial aos receptores beta-estrogênicos, sendo esta ligação mais estável que os outros estrogênios (ALVES & SILVA, 2002; MUELLER, 2002) e sugere-se que possa exercer ação através de caminhos separados daqueles dos estrogênios esteroidais clássicos (TAPIERO et al., 2002).

2.6 Mecanismo de Ação

Os estrogênios penetram as células livremente e fixam-se a receptores citoplasmáticos da superfamília de hormônios esteróides - tireóideos. Os receptores α e β dos estrogênios, contém 595 aminoácidos com diferentes seqüências, sendo variavelmente fosforilados (BERNE & LEVY, 2000).

Quando o hormônio fixa-se no receptor, o complexo citoplasmático resultante é transformado em um estado ativo e translocado para o interior do núcleo. Após dimerização o complexo fixa-se mais, eficientemente, aos elementos reguladores estrogênicos (EREs)

nos genes-alvo. Como resultado da fixação do complexo estrogênio – receptor ao EREs, a expressão genética é exacerbada ou suprimida, e várias proteínas aumentam ou diminuem de quantidade no tecido genital e em outros tecidos (BERNE & LEVY, 2000).

Os estrogênios causam quase todas as modificações que resultam no fenótipo feminino. O esqueleto, o rim, o fígado e a árvore vascular também são tecidos alvos dos estrogênios (BERNE & LEVY, 2000).

Os fitoestrogênios com maior ação estrogênica são as isoflavonas, destacando-se a genisteína, a daidzeína e a gliciteína, presentes no gérmen de soja. São compostos não esteróides, que se ligam fracamente aos receptores estrogênicos (menos que 1% da afinidade de ligação do estradiol).

Os mecanismos de ação das isoflavonas envolvem sua habilidade em se ligar (GLAZIER & BOWMAN, 2001) e modular seletivamente (MORITO et al., 2002) os receptores β de estrogênios (PETERSON et al., 1998).

2.7 Efeitos Farmacológicos e Indicações

Os efeitos das isoflavonas variam de tecido para tecido, dependendo da afinidade por receptores específicos (ANDERSON & GARNER, 1997). Em um trabalho de revisão Ferrari & Demiate (2001) abordaram os efeitos de fitoestrogênios sobre tecidos animais, destacando a capacidade desses compostos em melhorar a saúde humana principalmente por protegerem o organismo contra certas doenças crônicas.

Na falência ovariana (menopausa), ocorre uma redução drástica na produção de estrógenos endógenos e com isso uma série de alterações fisiológicas importantes manifesta-se com sintomas característicos, como ondas de calor, insônia, transpiração, mau humor, dor vaginal, dor de cabeça, nervosismo, depressão entre outros (SAKAMOTO & HALBE, 1995). Os estrogênios são a melhor arma contra estes sintomas da síndrome climatérica. No entanto, alguns estudos indicam o efeito das isoflavonas sobre os fogachos, com redução de 45% da sintomatologia, enquanto a terapia de reposição hormonal na menopausa convencional os reduz em 70%, em comparação ao placebo que reduziu 30% (CHUNG et al., 1996; LIVINALLE & LOPES, 2007).

A diminuição progressiva da massa óssea com o avançar da idade é um processo natural. As mulheres entretanto, apresentam maior incidência de fraturas que os homens por terem menor massa óssea e por sofrerem uma diminuição abrupta dos níveis de estrogênios na menopausa com conseqüente acentuação da perda. A freqüência da osteoporose ocorre com menor incidência em mulheres asiáticas do que nas dos países ocidentais (COOPER et al., 1992). Uma das possíveis justificativas para esta diferença se baseia na elevada ingestão de produtos de soja, ricos em isoflavonas (POTTER et al., 1998).

Vários possíveis mecanismos têm sido sugeridos para explicar os efeitos benéficos das isoflavonas de soja no tecido ósseo. Esteves & Monteiro (2001), descrevem que a genisteína e a daidzeína se ligam aos receptores β estrogênicos presentes nos osteoclastos e nos osteoblastos e desta forma incrementam o desenvolvimento das células – alvo. Segundo Anderson et al. (1997), doses baixas de genisteína agem similarmente aos estrógenos endógenos devido a sua habilidade em se ligar aos receptores estrogênicos no tecido ósseo e em doses elevadas, podem exercer efeitos potencialmente adversos às funções das células e tecidos ósseos. No entanto a constante de dissociação comparativa da genisteína para o receptor de estrogênio, determinada em experimentos de ligação competitiva, é 100 – 10.000 vezes maior que a do estradiol e dietilestibestrol (CLAPAUCH et al., 2002).

Os efeitos protetores dos estrogênios sobre a doença cardiovascular são manifestos através das alterações lipídicas, efeitos vasculares, sobre resistência insulínica e progressão de placa de arteriosclerose. A Federação Mundial de Cardiologia afirma que a soja interfere no metabolismo das gorduras, reduzindo o colesterol total, inclusive diminuindo o "mau" colesterol (LDL) e aumentando a quantidade do "bom" (HDL). A soja é fonte de omega 3 (tipo de substância que tem efeito protetor nas doenças cardiovasculares) e de isoflavonas (substância que atua de maneira protetora na camada íntima que recobre as artérias). Por isso, a soja tem efeito benéfico na prevenção da aterosclerose e da trombose, que são processos de obstrução das artérias (EMBRAPA, 2004b).

A *Food and Drug Administration* (FDA - agência dos Estados Unidos que regulamenta alimentos e medicamentos) emitiu um documento para oficializar o potencial terapêutico da soja na prevenção de doenças do coração. A FDA se baseou em estudos científicos para certificar que o consumo diário de 25 gramas de proteína de soja pode prevenir os riscos das doenças vasculares, reduzindo os níveis de colesterol total e do

"mau" colesterol (LDL). Observou-se, *in vitro*, vasodilatação coronária e redução na agregação plaquetária e na tromboxana, resultando em menor tendência pró-trombótica (NAHÁS et al., 2003)

As plaquetas participam na formação da rolha hemostática e são ativadas por exposição ao colágeno. Depois que ocorre a ativação, elas se aderem ao subentotélio lesado, ali se acumulam e ligam-se entre si formando um trombo que é posteriormente estabilizado (NAHÁS et al., 2003). A genisteína tem mostrado efeito na supressão da formação de trombo por inibição da ativação, do recrutamento e da agregação plaquetária. Dietas que incluem a isoflavona diminuíram a função plaquetária em ratos (SCHOENE & GUIRDY, 1999).

Devido ao seu efeito inibidor da proteína tirosina quinase, a genisteína vem sendo estudada como um composto regulador da secreção de insulina, cuja liberação é controlada por mecanismos complexos de sinalização celular que envolvem a ação nestes receptores. Os efeitos benéficos que vêm sendo observados em estudos com animais e culturas celulares sugerem que a genisteína pode ser uma alternativa no tratamento do diabetes, principalmente do tipo 2 (ESTEVES & MONTEIRO, 2001).

Em relação ao sistema nervoso central sabemos que os estrogênios estimulam a expressão de fatores neutrofílicos e a produção de acetilcolina e serotonina. Em ratos machos, dietas contendo alta concentração de fitoestrogênios mudaram significativamente a estrutura da região cerebral sexualmente dimórfica durante a vida adulta (PATISAUL et al., 2001; PATISAUL et al., 2002).

2.8 Efeitos Adversos

Os efeitos do consumo de soja têm sido bastante discutidos. Sua ação inclui efeitos estrogênicos e antiestrogênicos como: aumento do intervalo do ciclo menstrual, indução da diferenciação celular no câncer, inibição da tiroxina quinase, supressão da angiogênese, efeitos antioxidantes e outros. As pesquisas revelam, porém, que existem dúvidas quanto aos benefícios da utilização dos fitoestrogênios em relação aos seus riscos potenciais (CLAPAUCH et al., 2002).

A segurança das fórmulas comerciais contendo soja está sendo investigada devido a potencial ação hormonal dos fitoestrógenos em períodos críticos do desenvolvimento. Alguns estudos sugerem a ocorrência de carcinogênese, quando há exposição a genisteína, durante o período de diferenciação celular. Por isso o uso de fórmulas infantis baseadas em soja e a fabricação de produtos de soja destinados a crianças deveriam ser mais profundamente estudados (NEWBOLD et al., 2001).

A alta concentração de derivados de soja em algumas formulações pediátricas suscita preocupações relacionadas aos possíveis efeitos devidos à potencial ação hormonal dos fitoestrogênios em períodos críticos do desenvolvimento. A genisteína e a daidzeína inibem a tireoperoxidase, enzima responsável pela produção dos hormônios tireoidianos, podendo causar aumento de volume da glândula tireóide e hipotireoidismo (CLAPAUCH et al., 2005).

Estudos apontam que as isoflavonas são agentes anti-tireoidianos potentes, o que poderia afetar o crescimento e desenvolvimento. Adicionalmente, há pesquisas indicativas de que a exposição à isoflavonas pode causar doença crônica da tireóide em crianças alimentadas com soja ou complementos de soja. Diversas pesquisas também correlacionam casos de ingestão de isoflavonas com o desenvolvimento de bócio (FITZPATRICK, 1999).

Existem evidências epidemiológicas e clínicas de que, ao atuar como estrogênios, os fitohormônios poderiam adiantar a puberdade e o desenvolvimento de mamas nas meninas antes dos 7 ou 8 anos de idade; e promover ginecomastia nos meninos (TEILMANN et al., 2002).

Fortes et al. (2007) relata um caso de telarca precoce associada à ingestão excessiva de fitoestrogênios (< 40mg/dia). Uma menina de 4 anos e 9 meses que apresentava desenvolvimento puberal, os níveis hormonais e ultra-sonografia pélvica compatíveis com puberdade precoce periférica. Os pais foram aconselhados a reduzir ingestão de formulas baseadas em soja e conseqüentemente o desenvolvimento puberal cessou, a paciente, com 8 anos e 8 meses, continuou a desenvolver-se com idade óssea e cronológica equivalentes.

Foi descrita maior incidência de hipospádia em humanos cujas mães seguiram uma dieta vegetariana rica em fitoestrogênios durante a gravidez (NORTH & GOLDING, 2000). McClain (2007), relata a redução do espaço anogenital em filhotes machos de ratas tratadas com genisteína do 6º ao 20º dia de gestação. A exposição neonatal à genisteína altera a

resposta pós-puberal do hipotálamo ao hormônio liberador das gonadotrofinas em ratos (WHITTEN, et al., 1995).

Mulheres na pré-menopausa que consomem isoflavonas da soja por tempo prolongado mostraram um efeito estimulatório nas mamas, caracterizado por aumento de secreção de líquidos, aparecimento de células epiteliais hiperplásicas e níveis elevados de estradiol, sugerindo um estímulo estrogênico.

O aumento significativo de risco de carcinoma de mama, tumores estrogênicos dependentes em humanos, carcinomas de pulmão, também são atribuído aos xenoestrogênicos e à genisteína, principalmente durante o crescimento e a adolescência (CLAPAUCH et al., 2002). A mesma situação, existe na descrição do caso de uma mulher na qual foi diagnosticado adenocarcinoma de endométrio de grau I, cuja história era notável pelo uso excessivo, nos 4 anos anteriores, de vários tipos de fitoestrógenos como suplementos (JOHNSON et al., 2001).

Alta dose de genisteína parece ter efeito proliferativo sobre o útero de ratas, efeito este menor, quando comparado ao efeito do estrogênio endógeno. No mesmo estudo, foi sugerido que o fitoestrogênio pode também reduzir a ação do estrogênio quando administrado simultaneamente (FOLMAN & POPE, 1966).

Em humanos, uma dieta rica em isoflavonas ou outros suplementos em mulheres menopausadas, não demonstraram aumento da espessura do endométrio ao ultra-som. Porém, os estudos em animais, mostram resultados contraditórios. Um dos estudos, com o uso de altas doses de isoflavona, demonstrou efeitos proliferativos semelhantes aos dos estrogênicos sintético (HALE et al., 2002).

2.9 Avaliação da Toxicidade Reprodutiva

No Brasil, a Resolução 90/04 (*Diário Oficial da União* – 18/03/04) do Conselho Nacional de Saúde estabelece estudos de toxicologia pré-clínica, para registro e renovação de registro de fitoterápicos. Cinco tipos de ensaios de toxicidade: aguda, subaguda, crônica, teratogenia e embriotoxicidade e estudos especiais. A lista de estudos pode variar de um país para outro, mas basicamente inclui os seguintes tópicos: informações preliminares, toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, toxicidade crônica, mutagênese e

carcinogênese, reprodução e embriofetotoxicidade, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea e ecotoxicidade (BARROS & DAVINO, 2008).

Segundo a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição. Desta forma, faz-se necessário conhecer as condições de uso seguro de substâncias químicas para a saúde. A toxicidade de uma substância a um ser vivo pode ser considerada como a capacidade de causar dano grave ou morte (BARROS & DAVINO, 2008).

A toxicologia do desenvolvimento estuda os efeitos adversos que ocorrem nos organismos, decorrentes da exposição às substâncias químicas antes da concepção, isto é, dos pais durante o desenvolvimento perinatal ou pós-natal até a puberdade. Essa tecnologia do desenvolvimento engloba a embriofetotoxicidade e a toxicologia da reprodução.

A embriofetotoxicidade estuda as alterações induzidas durante o desenvolvimento, entre a concepção e o nascimento, enquanto a toxicologia da reprodução se encarrega do estudo dos efeitos adversos que ocorrem nos sistemas reprodutor masculino e feminino resultantes da exposição a agentes químicos (BARROS & DAVINO, 2008).

Entre os mamíferos a reprodução constitui um processo complexo, prolongado e que envolve várias etapas tornando-se desta forma vulnerável à interferência ambiental ou à influência de vários agentes incluindo plantas e/ou substâncias químicas. A Figura 1 sintetiza os diversos estágios do ciclo reprodutivo de mamíferos (LEMONICA, 2008).

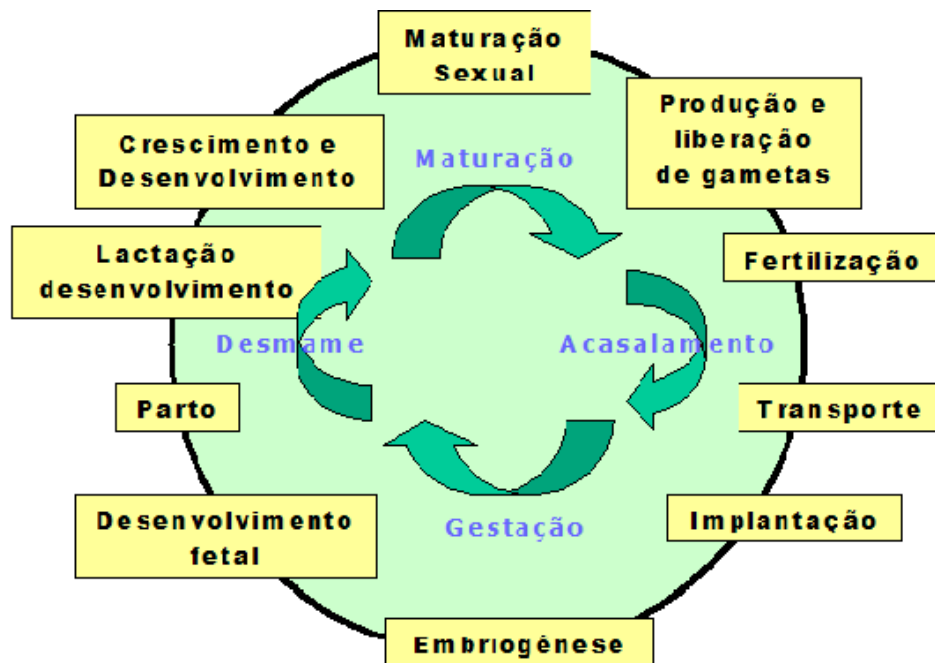


Figura 1. Ciclo reprodutivo de mamíferos (LEMONICA, 2008).

A reprodução dos mamíferos é um processo cíclico constituído de várias fases, as quais se dividem em quatro estágios diferenciados que correspondem às etapas do desenvolvimento pré e pós-natal, o amadurecimento sexual e o acasalamento. No ciclo reprodutivo, pode-se verificar que em cada fase estão relacionados vários eventos que podem ser modificadas pela exposição a agentes químicos (LEMONICA, 2008).

2.10 Uso de Medicação Durante a Gestação

Vários são os cenários que envolvem a segurança do uso de medicações durante o período de gestação. Tal ação em qualquer mulher ou animal em idade reprodutiva deve ser criteriosa, principalmente, durante a gestação. Nestes casos, a exposição ao fármaco ocorre durante a fase mais vulnerável do desenvolvimento embrionário (WEBSTER & FREEMAN, 2001).

Quando uma gestante é exposta a um agente químico, o organismo embriofetal não é o alvo primário e sim secundário da substância em questão; e seu efeito sobre esse organismo vai depender de uma série de fatores.

Durante o período de gestação, a exposição materna a um agente tóxico pode levar a respostas diversas e seu efeito final variar desde a morte até o nascimento de indivíduo normal. Essa variação de resposta se deve ao fato de que o efeito embriofetotóxico de uma substância química está diretamente regulado por alguns fatores: genótipo do embrião, resposta ao agente teratogênico e estágio de desenvolvimento no qual se encontra o conceito no momento da exposição (LEMONICA, 2008).

A Figura 2 demonstra que durante o período de gestação, a exposição materna a um agente químico tóxico pode levar a respostas diversas e seu efeito final variar desde a morte até o nascimento de indivíduo normal.

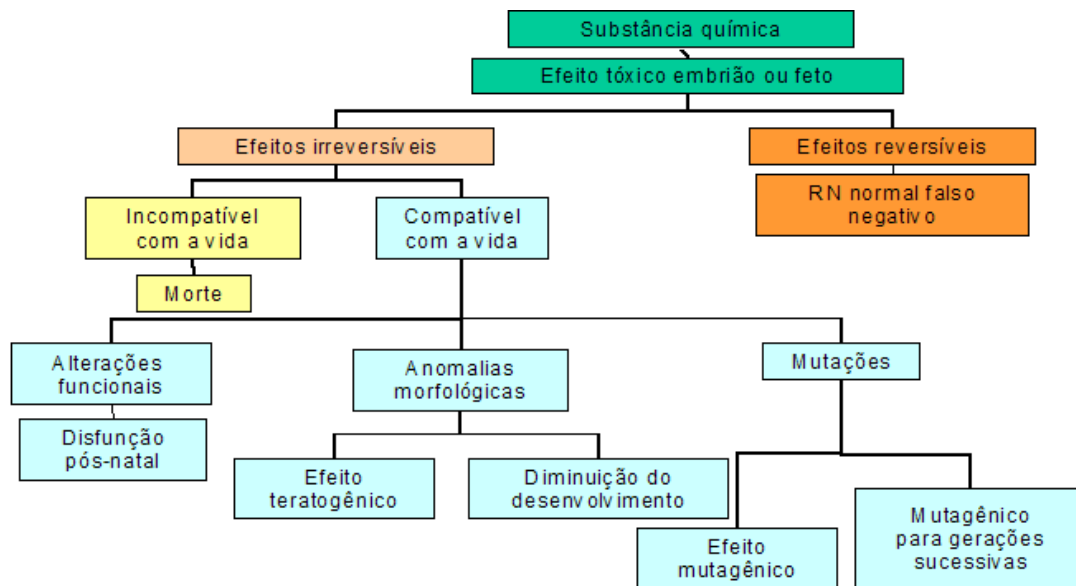


Figura 2. Resultados finais da exposição materna aos agentes químicos durante o período de gestação (LEMONICA, 2008).

O período de gestação pode, com relação à sensibilidade a agentes teratogênicos, ser dividido em três estágios diferentes. O primeiro compreende o período que vai desde a fecundação até a implantação do blastocisto. Após implantado, o embrião inicia uma fase delicada com intensa proliferação celular, movimento e deslocamento de massa celular e complicados sistemas de interação núcleo/citoplasma e intercelulares.

Inicia-se, então, o chamado período organogênico, fase mais suscetível à ação de agentes teratogênicos e único período teratogênico da gestação. O tipo de malformação

depende ainda da fase evolutiva do embrião e da afinidade do agente químico pelo tecido embrionário, sendo que para cada espécie existem períodos diferentes de sensibilidade.

Cessado o período embrionário inicia-se o período fetal, caracterizado pela diferenciação histológica e funcional dos diferentes órgãos e aparelhos, além de um notável crescimento ponderal do concepto.

Os agentes teratogênicos administrados nas progenitoras nesse período não levam ao aparecimento de malformações, mas podem interferir com processos de proliferação celular que resultam em alterações funcionais de importantes sistemas, tais como sistema nervoso central, sistema imune ou sistema endócrino, além de causar retardo geral de desenvolvimento (LEMONICA, 2008).

2.11 Teste de Toxicidade Pré-natal

Os agentes teratogênicos sempre produzem suas ações por interferirem nos mecanismos celulares, em doses que causam nenhuma ou mínima toxicidade materna, desde que se pretende estudar os efeitos na prole e não aqueles ligados à toxicidade materna.

Porém, alguns medicamentos quando administrados durante a prenhez e mesmo no período neonatal, podem induzir efeitos nocivos na prole (BERNARDI, 1999). Visto que um dos principais objetivos dos testes de teratogenicidade é o de evidenciar possíveis riscos de substâncias químicas para o homem, esses testes são realizados prevalentemente sobre embriões de mamíferos (LEMONICA, 2008).

A escolha dos animais de experimentação é muito importante, pois os resultados podem variar dependendo da espécie. São úteis os animais que possuem período de gestação curto e prole numerosa (LEMONICA, 2008).

Com relação aos modelos biológicos, a legislação vigente recomenda que os testes de toxicidade reprodutiva e teratogenicidade sejam realizados em pelo menos duas espécies animais; sendo que os ratos são os modelos preferenciais (MELLO & LANGELOH, 2006).

Os ratos (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar, albinos, devem ter procedência confiável, de biotério que obedeça as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

(COBEA, 1996) quanto aos procedimentos técnicos empregados na criação (MELLO & LANGELOH, 2006).

Esses animais possuem características anatômicas e embriológicas como: útero bicórneo, no qual os sítios de implantação se distribuem regularmente, número de filhotes elevado, a placenta do tipo hemocorial, como no homem e a possibilidade da realização de controle adequado da população em laboratórios (LEMONICA, 2008). As ratas são poliéstricas anuais, ou seja, manifestam vários ciclos estrais de 4 a 5 dias, ao longo de um ano. A gestação de ratas é de 20 a 23 dias, sendo que o tempo de duração mais freqüente corresponde a 21 dias (COBEA, 1996).

As agências normativas internacionais estabelecem, de acordo com o produto a ser testado, elaboração de protocolos que resumem testes chamados de três segmentos e que abrangem todos os períodos do ciclo evolutivo (MELLO & LANGELOH, 2006; LEMONICA, 2008). A Figura 3, sintetiza os três segmentos dos estudos de toxicologia reprodutiva, conforme normas da EPA (*Environmental Protection Agency*) e recomendações do FDA (*Food and Drug Administration*) e do OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*).

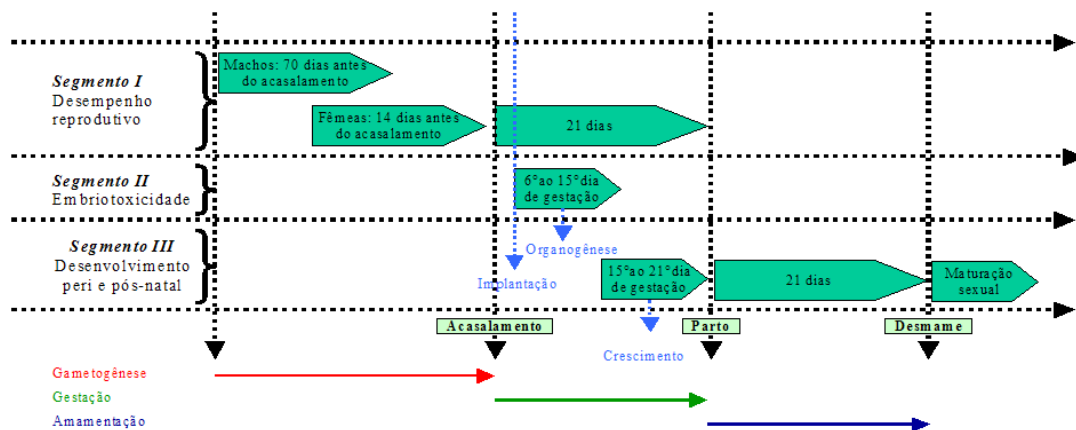


Figura 3. Períodos de tratamento em testes de toxicidade reprodutiva em ratos (LEMONICA, 2008).

As substâncias quando utilizadas no período de organogênese (segmento II) podem levar à teratogênese; se a lesão for compatível com a vida do animal ou à embrioletalidade, caso não seja. Cada um dos sistemas em formação apresenta um período crítico, no qual ele é mais suscetível ao agente. No rato, por exemplo, o ácido acetilsalicílico só é capaz de

produzir fenda palatina se o feto for exposto entre o 10° e 16° dias de gestação, período em que se forma o palato.

Quanto maior for o período de formação de um determinado sistema, maior será o risco de seu desenvolvimento ser afetado por um determinado agente. Por isso, nos testes de teratogenicidade são estudadas as possíveis anomalias ósseas dos animais, pois o período de organogênese do esqueleto é bastante longo (BERNARDI, 1999). A Figura 4 ilustra os períodos críticos do desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato, bem como são descritas algumas de suas características.

As substâncias endógenas ou exógenas que atravessam a placenta penetram na circulação do feto através da via umbilical e passam pelo fígado do feto antes de atingir o coração e a circulação sistêmica. O líquido amniótico é o mais importante reservatório de substâncias exógenas do feto, e também a principal via de excreção (BERNARDI, 1999).

Dias de gestação															Dias de lactação 1 a 21 dias pós-natal							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Período neonatal	
Implantação					Organogênese					Desenvolvimento fetal												
Não susceptível à teratogênese. Divisão do zigoto implantação formação do blastocisto					Olho																	
					Cérebro					Período de maturação e diferenciação do cérebro												
					Coração e arcos aórticos																	
					Esqueleto axial																	
					Palato																	
					Sistema urogenital																	
Morte pré-natal					Anomalias maiores					Anomalias Morfológicas menores e funcionais					Maturação de receptores diferenciação sexual do cérebro, formação de sistemas enzimáticos							

Figura 4 . Períodos do desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato (BERNARDI, 1999).

2.12 Teratogenicidade Relacionada aos Fitoestrógenos

Informações têm relacionado o aparecimento de deformidades/anomalias

morfológicas em seres humanos, especialmente hipospádia, aos hábitos vegetarianos. Além de pesticidas e fertilizantes artificiais utilizados sobre os vegetais, os fitoestrógenos são indicados como possíveis responsáveis pela elevada incidência de deformidades, maior em filhos de pais vegetarianos (SOYONLINESERVICE–www.soyonlineservice.co.nz/index.htm).

Os estudos mostraram que a genisteína pode causar retardamento do ciclo celular e alterações no desenvolvimento do embrião. O efeito parece estar ligado à inibição de enzimas como a tiroxina proteína quinase (JACQUET et al., 1995). Pensa-se que a genisteína inibe a atividade epidermal da tiroxina proteína quinase, o receptor do fator de crescimento (EGF), reduzindo o efeito positivo do EGF no incremento da glicose. Sendo a glicose a principal fonte de energia exógena para o desenvolvimento do embrião na pré-implantação, esperar-se-ia afetar dramaticamente o desenvolvimento embrionário esperado (HEO & HAN, 2006).

Bogoliubova (1999), sugere que a genisteína pode inibir o desenvolvimento embrionário alterando a estrutura e a função mitocondrial. Entretanto, os estudos indicam que o efeito inibitório da genisteína no desenvolvimento embrionário é devido também à inibição da tiroxina proteína quinase “*in vitro*”, na fase de pré-implantação.

No estudo “*in vitro*” com cultura embrionária as amostras foram expostas a concentrações diferentes de genisteína 0, 3, 10, 30 e 100 µg/ml. Onde as dose ≥ 10 µg/ml determinaram anormalidades. As doses 10 µg/ml e 30 µg/ml foram responsáveis pelo aparecimento de embriões com desenvolvimento inferior. Na dose 100 µg/ml todos os embriões desenvolveram malformações, sinais de embriotoxicidade e baixo desenvolvimento em relação as demais doses (McCLAIN et al., 2007). Em estudo piloto, a suspensão oral com genisteína foi administrada no período do 6° ao 20° dia de gestação de ratas. Foram testadas as doses: 0, 20, 150 e 1000 mg/kg/dia de genisteína. Na maior dose testada, 1000 mg/kg/dia, observou-se o menor ganho de peso das ninhadas durante o período de lactação. Na dose intermediária, de 150 mg/kg/dia e a dose de 1000 mg/kg/dia ocorreram alguns óbitos, com menor média do peso corporal individual ao nascer e diferença estatística em relação aos demais grupos. No mesmo estudo constatou-se reduções do espaço anogenital em fetos machos na avaliação macroscópica externa, alterações viscerais tais: como hipoplasia do timo e ausência de epidídimo e testículo;

displasia renal, hipoplasia testicular e ausência de artérias. Na avaliação esquelética foram observadas anomalias no esterno, costelas e ossificação incompleta (McCLAIN, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da administração de uma formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) durante o período de organogênese em ratas Wistar.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) nas progenitoras tratadas do 6^o ao 15^o dia de gestação, referente às variáveis de toxicidade sistêmica.
- Avaliar os efeitos da formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) sobre o desenvolvimento de progênes expostas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação da toxicidade das formulações fitoterápicas comerciais foi utilizado o segmento II de avaliação de toxicidade pré-natal conforme recomendação da Administração de Drogas e Alimentos (FDA - *Food and Drug Administration*), Organização para o desenvolvimento e cooperação econômica (OECD - *Organization for Economic Cooperation and Development*) e Agência de Proteção Ambiental (EPA - *Environmental Protection Agency*).

4.1 Animais

Foram utilizados 128 ratos Wistar, sendo 60 fêmeas virgens, com massa corporal média aproximada de 250g e 20 machos da mesma espécie, com massa corporal média aproximada de 250g, com idade de 90 dias, provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os animais foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), em caixas de polipropileno, separados por sexo, com temperatura controlada (21 +/- 2°C), ciclo de luz claro/escuro de 12 horas. Receberam alimentação com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital[®], Colombo/PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Sendo que antes do início do período experimental, os animais passaram por um período (7 dias) de adaptação as condições do biotério setorial.

4.2 Preparação Fitoterápica

O fitoterápico utilizado foi adquirido em estabelecimento farmacêutico local. A preparação comercial Soyfemme[®] 150 mg ("S") com composição declarada em bula: Extrato seco de *Glycine max* (L.) Merr. 40 % na concentração de 150mg, sendo a concentração de marcador de 60mg de isoflavona e excipientes contendo celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, silicato de magnésio e estearato de magnésio.

4.3 Tratamento

O fitoterápico foi diluído em água destilada, de forma que as diferentes doses pudessem ser administradas em volume idêntico (10ml/Kg). A solução então foi administrada pela via oral (gavagem), durante o período que compreendeu a organogênese (6° ao 15° dia de gestação).

Foram formados cinco grupos experimentais com 12 fêmeas cada:

- o grupo controle negativo (GC-) recebeu água destilada (10ml/kg);
- o grupo controle positivo (GC+) recebeu 4,27 mg/kg/dia de isoflavonas de uma mistura contendo aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína, semelhante a existente na soja;
- o grupo do fitoterápico “S” dose terapêutica (GS1) a dose indicada pelo fabricante da medicação (1,72 mg de isoflavonas em 10ml de água destilada);
- o grupo do fitoterápico “S” dose dois (GS2) tratado com uma dose intermediária (média geométrica) entre a menor dose e a maior dose do fármaco (8,6mg de isoflavonas em 10 ml de água destilada);
- o grupo do fitoterápico “S” (GS3) foi tratado com a maior dose, dez vezes a dose indicada pelo fabricante (17,2mg de isoflavonas em 10 ml de água destilada).

O tratamento foi preconizado pela parte da manhã.

4.4 Procedimentos

Os procedimentos adotados foram: avaliação do ciclo estral; acasalamento e diagnóstico de gestação; laparotomia e avaliação do desempenho reprodutivo materno aos 21 dias de gestação; avaliação dos fetos aos 21 dias de gestação e, por último, avaliação das anomalias esqueléticas.

4.4.1 Avaliação do Ciclo Estral, Acasalamento e Diagnóstico de Gestação

No primeiro dia do período de acasalamento as ratas foram distribuídas em grupos de três, em caixas polietileno (40 x 33 x 16,5 cm). No final da tarde (início do período escuro), era colocado um macho em cada uma das caixas de fêmeas e na manhã subsequente (término do período escuro), os machos eram separados e o esfregaço vaginal então era coletado (com auxílio de cotonete).

O fator indicativo de prenhez foi a presença de espermatozóides no esfregaço vaginal da fêmea. E somente ou na sua maioria células queratinizadas (estro), no esfregaço vaginal realizado ao fim de cada acasalamento e analisado ao microscópio óptico com aumento de dez vezes.

Eram preconizados para o acasalamento as fêmeas previamente examinadas (dia anterior) e que apresentavam na análise do esfregaço vaginal, células compatíveis com as fases de proestro e estro do ciclo estral. O diestro foi considerado quando observada grande quantidade de leucócitos no esfregaço vaginal, com ou sem a presença de muco. O proestro quando se encontrou predominância de células epiteliais nucleadas. O estro quando apresentava somente ou na sua maioria célula queratinizadas; e a fase de metaestro quando o achado foi de células queratinizadas e de leucócitos.

As vinte e quatro horas após a constatação do acasalamento e estro, foram consideradas o primeiro dia de gestação.

4.4.2 Laparotomia e Desempenho Reprodutivo Materno aos 21 dias de Gestação

Durante a gestação as fêmeas foram mantidas em caixas (29,5 x 18,5 x 11 cm) plásticas individuais, com maravalha limpa, recebendo 500ml de água e 200g de ração, renovados durante todo o período. No intuito de monitorar alguns parâmetros que pudessem indicar toxicidade materna foram acompanhados, ganhos de massa corporais, consumos hídricos, consumos de ração e mortalidade.

A massa corporal das ratas gestantes foi mensurada diariamente e relacionada à massa corporal do dia zero de prenhez, considerada 100%, utilizando-se a relação:

$$\text{Massa Corporal} = \frac{\text{Massa corporal diária (g)}}{\text{Massa corporal do dia zero (g)}} \quad \times \quad 100$$

Os consumos de água e ração foram medidos todos os dias e relacionados à massa corporal do mesmo dia, com forme as fórmulas:

$$\text{Consumo de água} = \frac{\text{Consumo de água (ml)}}{\text{Massa corporal do mesmo dia (g)}} \times 100$$

$$\text{Consumo de ração} = \frac{\text{Consumo de ração (g)}}{\text{Massa corporal do mesmo dia (g)}} \times 100$$

No 21º dia de gestação, às 8horas, as ratas foram anestesiadas (zolazepam + tiletamina na dose de 5mg/kg pela via intramuscular) e em seguida decapitadas com a utilização de guilhotina para a realização da laparotomia. As fêmeas foram inspecionadas em busca de sinais de alterações. Os cornos uterinos então foram expostos para contagem dos sítios de implantação e pontos de reabsorção. Logo após procedia-se a remoção do útero gravídico e sua pesagem.

Na abertura o útero foi incisado com tesoura em toda sua extensão, iniciando no corno uterino direito caudal ao ovário direito, longitudinalmente, até o corpo do útero e seqüencialmente pelo corno uterino esquerdo até porção caudal ao ovário esquerdo, para a identificação do feto e sua posição no útero durante o período de desenvolvimento. Em seguida, o número de fetos foi contado e cada feto foi pesado individualmente.

Para a determinação da perda embrionária após a implantação foi utilizada a proporção:

$$\% \text{de perda pós-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de implantações} - \text{n}^\circ \text{ de fetos nascidos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantações}} \times 100$$

Para a determinação da taxa de alterações macroscópicas externas:

$$\text{Taxa de alterações} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos com alterações}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

4.4.3 Avaliação dos fetos aos 21 dias de gestação

Após a retirada do útero cada filhote foi inspecionado, conforme sua ordem no útero: da direita para a esquerda. Na inspeção individual, foi mensurada a massa corporal (g), e posteriormente, examinado macroscopicamente, quanto a vitalidade, possíveis anomalias e malformações externas tais como: conformação craniana, implantação das orelhas, palato, conformação da cauda, das patas e perfuração anal.

4.4.5 Avaliação das Alterações Esqueléticas

As ninhadas foram examinadas quanto à presença de alterações esqueléticas, através de método de coloração adaptada (TAYLOR & VAN DYKE, 1985) e baseadas em Atlas de anomalias ósseas e externas em ratos (CHAHOU, 1996). Neste método de coloração, os fetos foram fixados em imersão de solução de formalina 5%, por um período mínimo de sete dias.

No final desse período, os fetos foram transferidos de frascos coletivos, por ninhada, para cubas de vidro tampadas, com separação metálica que garante a individualização de cada feto. A desidratação processou-se mediante a troca da solução de formalina 5% por uma solução de álcool etílico 70%, permanecendo por quarenta e oito horas, e então por álcool etílico absoluto, por mais vinte e quatro horas.

Os fetos, então, já sexados foram eviscerados através de abertura realizada na região abdominal, próximo a cartilagem xifóide, através da qual foram removidos todos os órgãos das cavidades abdominal e torácica. Além da evisceração, que favorece o processo de coloração, procedeu-se a retirada da camada de tecido adiposo localizada sobre a região dorsal das vértebras cervicais e entre as escápulas, com a mesma finalidade.

Em seguida foram realizadas as trocas das soluções de desidratação por outras contendo sete partes de água destilada para três partes de solução saturada de borato de sódio (solução de neutralização). Os fetos ficaram imersos nesta solução por dois dias.

A clarificação foi obtida mediante a imersão dos fetos na solução de neutralização acrescida de 1g de tripsina por litro, trocada sempre que apresentava turbidez, e mantida

até que as estruturas musculares dos fetos estivessem completamente transparentes. Para uma maior eficiência dessa fase de processamento, as cubas com os fetos foram colocadas dentro de uma estufa com temperatura média de 37°C por períodos aproximados de 4 horas diárias.

Após ficaram em imersão por vinte e quatro horas em uma solução aquosa de KOH 1,5% e o corante de alizarina (0,5µmg/200ml de solução aquosa de KOH 1,5%) para a coloração das estruturas esqueléticas.

No final do período foram preparadas três soluções de armazenamento, com glicerina P.A. 30% e 70% em solução aquosa de KOH 1% e uma com glicerina P. A. 100%. Os fetos permaneceram durante 48 horas imersos em cada uma dessas soluções até serem armazenados para análise em glicerina 100%. A Figura 5 ilustra as bandejas com divisórias onde os filhotes corados e clarificados foram mantidos de forma individual, até a avaliação esquelética.

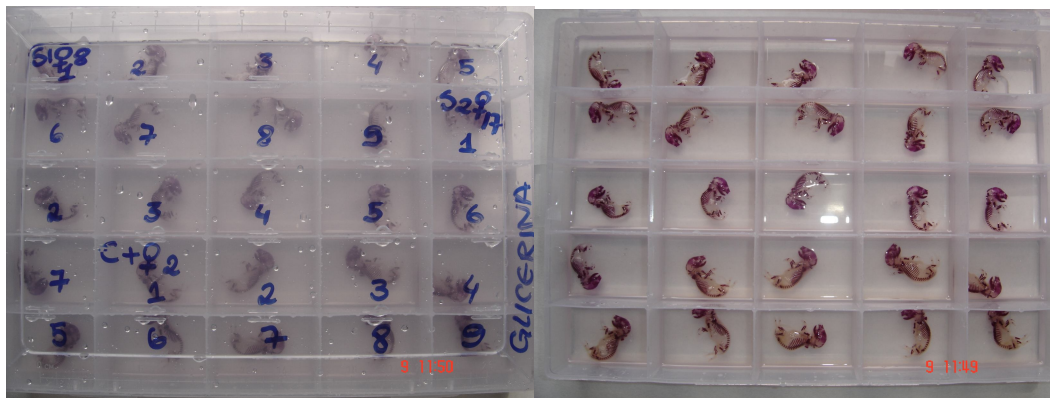


Figura 5. Bandejas com os filhotes de ratas tratadas entre o 6° e o 15° dias de gestação, corados com vermelho de alizarina e clarificados com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985).

Para avaliar a estrutura esquelética cada feto foi retirado de seu local de estocagem e colocado em placa de Petri e levada a um microscópio binocular estereoscópio com aumento de 2 a 4 vezes.

O procedimento com os fetos diafanizados foi realizado seguindo-se o Atlas de Anomalias Externas e Esqueléticas em Ratos, produzidos pelo Instituto de Farmacologia e Toxicologia Clínica da *Freie Universitat Berlin* (CHAHOU & FAQI, 1997).

A Figura 6 apresenta um feto de rata do grupo GS3, tratada entre o 6º e o 15º dias de gestação, com uma formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®), preparado para a análise esquelética.



Figura 6. Feto de uma rata do grupo GS3, tratada entre o 6º e o 15º dias de gestação, com uma formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®), corado com vermelho de alizarina e clarificado com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985), preparado para a análise esquelética.

O esqueleto foi examinado de forma sistemática, da cabeça, à cauda. Foram meticulosamente analisados os ossos do crânio, as vértebras, as costelas, o esterno, os membros anteriores, os membros posteriores e a pélvis.

Todos os ossos da cabeça foram examinados quanto ao tamanho, forma, adição ou ausência óssea e quantificação óssea (mineralização). Os ossos da cabeça analisados foram: nasal, frontal, parietal, interparietal, supra-occipital, pré-maxilar, maxilar, zigomático,

escamoso, exoccipital, volmer, palato, presfenóide, basisfenóide, hámulo, basoccipital, orbitoesfenóide, timpânico e mandíbula.

Com relação às vértebras, cada uma delas consiste em três partes (um centro e dois arcos). A análise foi realizada quanto à adição ou ausência de vértebras, fusão (entre os arcos ou entre os centros), malformação nos centros (fechamento interrompido, divisão simétrica ou assimétrica, forma irregular e ossificação adicional) e retardo ósseo. As vértebras analisadas foram: 7 cervicais, 13 torácicas, 6 lombares, 5 sacrais e caudais (número variável).

As costelas foram examinadas quanto ao número, comprimento, localização, fusão, forma e intensidade de ossificação. O número total de costelas torácicas de cada lado corresponde ao número de vértebras torácicas (13 em roedores).

O esterno foi estudado quanto à ausência ou adição do número dos centros esternais, fusão, forma e alinhamento. O esterno consiste em seis pontos de ossificação, manúbrio, quatro centros esternais e processo xifóide.

O gradil peitoral consiste em duas clavículas e duas escapulas e o gradil pélvico em duas cristas ilíacas, dois ísquios e dois púbis. A análise das modificações da espessura, do comprimento, da fusão e da forma do gradil foram anotados.

A análise dos ossos longos procurou verificar se havia fusões, alterações de forma, do comprimento ou ausência de ossos. Os ossos longos dos membros torácicos são: úmero, rádio e ulna; e dos membros pélvicos são: fêmur, tíbia e fíbula.

Os demais ossos, metacarpos, metatarsos e falanges dos membros também foram estudados. Os ossos foram inspecionados quanto à posição irregular, fusão, ausência ou número maior de dedos e a não ossificação.

4.5 Variáveis Avaliadas

Fêmeas:

- massa corporal diária (g), durante a gestação;
- consumo diário de ração (g), durante a gestação;
- consumo diário de água (ml), durante a gestação;
- sinais de aborto;

- sinais clínicos de intoxicação sistêmica;
- percentual de mortalidade durante o experimento;
- alterações macroscópicas do útero;
- número de implantes uterinos;
- peso da ninhada;
- taxa de perdas pós-implantação.

Filhotes:

- alterações macroscópicas externas em todos os filhotes;
- número de filhotes por ninhada;
- número de machos e de fêmeas;
- número de filhotes vivos;
- número de filhotes mortos;
- peso individual dos filhotes;
- percentual de alterações ósseas nos fetos corados;
- tipo de alterações ósseas nos fetos corados;
- teratogenia.

4.6 Análise Estatística

Os dados foram avaliados, estatisticamente, e as diferenças consideradas significativas, com confiança de 95% ($p < 0,05$).

As variáveis quantitativas referentes à influência das diferentes doses, sobre ao ganho relativo de massa corporal, consumo de água e ração diária, os índices reprodutivos, o número de fetos e a massa corporal dos fetos foram comparadas através da análise de variância (ANOVA). E em seguida a comparação entre médias utilizando o Teste de Tukey sempre que se fez necessário.

As variáveis qualitativas referentes ao percentual de má-formações dos fetos e índices fetais, como proporção de sexo foram comparadas pelo teste qui-quadrado.

Utilizaram-se os programas Microsoft Office 2000 Premium – Microsoft Excel e SPSS 13.0 for Windows.

4.7 Comitê de Ética

Aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP 2007777) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da toxicidade materna

5.1.1 Ganho relativo de massa corporal

A Figura 7 mostra o ganho relativo de massa corporal (1° dia de gestação = 100%) durante 21 dias de gestação, calculado diariamente a partir da mensuração da massa corporal (g) das ratas tratadas. Os grupos receberam: (GC-) água destilada 10ml/kg; (GC+) 4,27 mg/kg de isoflavonas de uma mistura semelhante a soja (aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína); (GS1) 1,72; (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de isoflavona de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]), por via oral, durante o período de organogênese (6° ao 15° dia de gestação). Foram comparados estatisticamente três momentos da avaliação do ganho de massa corporal (5°, 15° e 21° dia de gestação). No 5° dia, último dia do período de implantação, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos testados: GC- ($103,18 \pm 2,58$), GC+ ($103,42 \pm 1,87$), GS1 ($103,75 \pm 2,17$), GS2 ($102,31 \pm 2,33$) e GS3 ($103,90 \pm 2,04$), demonstrando que os grupos formados mantiveram um ganho relativo de massa homogêneo. No 15° dia, o grupo GS2 ($113,70 \pm 4,60$), evidenciou ganho relativo de massa inferior, apresentando diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). No dia da cesariana, 21° dia da gestação, o ganho de massa corporal dos grupos GC- ($146,87 \pm 4,53$), GC+ ($145,85 \pm 6,94$), GS1 ($145,28 \pm 5,29$) e GS3 ($141,02 \pm 11,24$) não demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O grupo GS2 ($136,62 \pm 8,71$) apresentou a menor percentagem de ganho de massa corporal, evidenciando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparado aos grupos controle GC- e GC+.

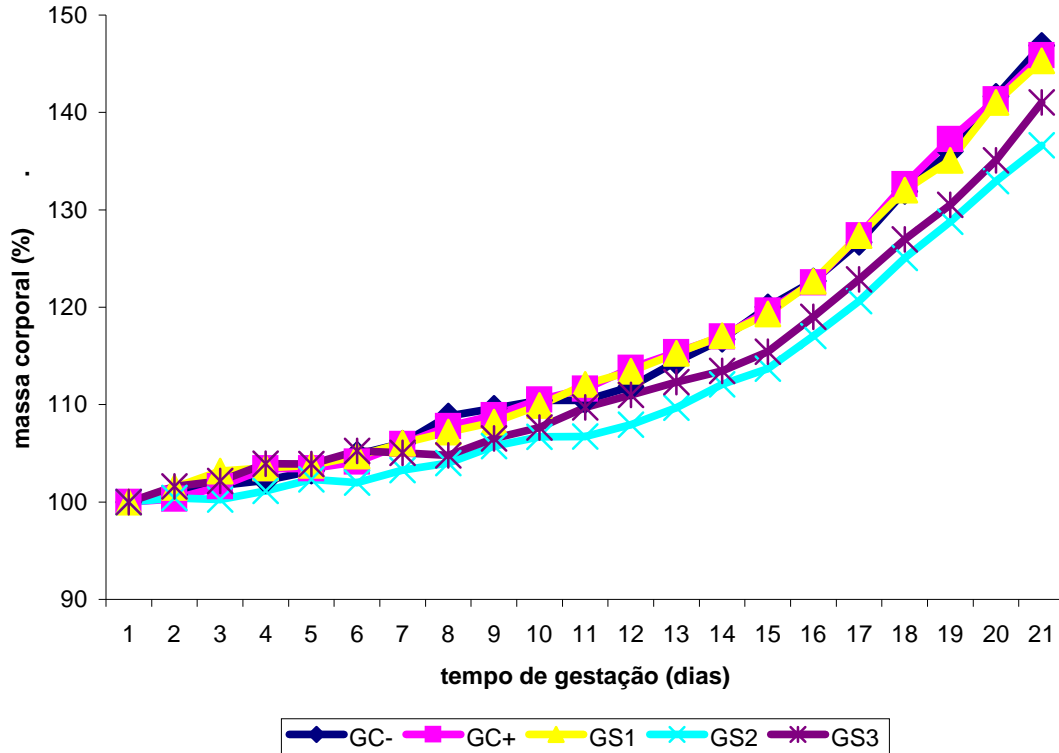


Figura 7. Desenvolvimento ponderal das ratas (1° dia = 100%) tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 12) durante o período gestacional.

5.1.2 Consumo de ração

A Figura 8 mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), acompanhado durante os 21 dias de gestação. Os grupos receberam: (GC-) água destilada 10ml/kg; (GC+) 4,27 mg/kg de isoflavonas de uma mistura semelhante a soja (aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína); (GS1) 1,72; (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de isoflavona de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®), por via oral durante o período de organogênese (6° ao 15° dia de gestação). Foram comparados estatisticamente três momentos da avaliação do consumo de ração (5°, 15° e 21° dia de gestação). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparados os grupos, no 5° dia de gestação, GC- (8,51g

$\pm 1,52$), GC+ ($9,30g \pm 4,45$), GS1 ($7,42g \pm 1,29$), GS2 ($8,39g \pm 1,64$) e GS3 ($8,57g \pm 1,54$) e no 15º dia de gestação ($p > 0,05$), GC- ($7,20g \pm 1,72$), GC+ ($6,93g \pm 0,83$), GS1 ($7,87g \pm 3,41$), GS2 ($8,51g \pm 2,16$) e GS3 ($7,99g \pm 1,62$). No 21º dia de gestação, os grupos GC+ ($7,42g \pm 1,01$), GS1 ($7,40g \pm 0,94$), GS2 ($7,44g \pm 1,49$) e GS3 ($7,48g \pm 1,25$), demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle negativo (GC- ($6,46g \pm 1,85$)).

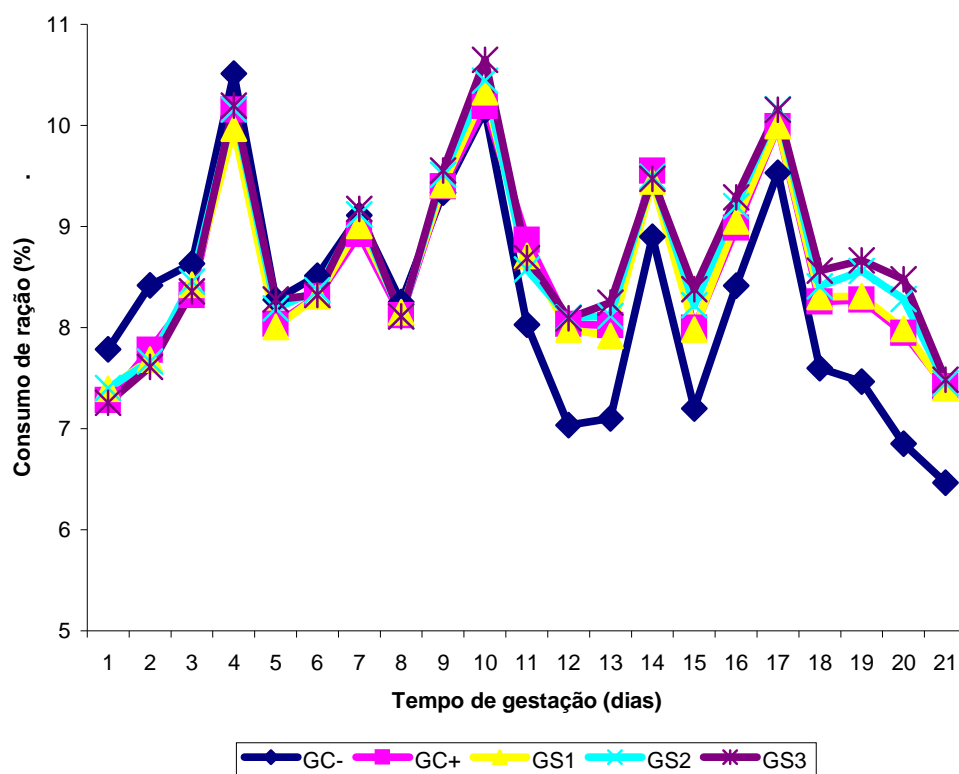


Figura 8. Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal durante a gestação de fêmeas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6º ao 15º dia de gestação. Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 12).

5.1.3 Ingestão hídrica

A Figura 9 mostra o consumo de água em relação à massa corporal (%), mensurado durante os 21 dias de gestação. Os grupos receberam: (GC-) água destilada 10ml/kg; (GC+) 4,27 mg/kg de isoflavonas de uma mistura semelhante a soja (aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína); (GS1) 1,72; (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de isoflavona de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]), por via oral durante o período de organogênese (6° ao 15° dia de gestação). Foram comparados estatisticamente três momentos da ingestão de água durante a gestação (5°, 15° e 21° dia de gestação). Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos no 5° dia de gestação, GC- (16,48ml \pm 6,61); GC+ (16,23ml \pm 3,43); GS1 (13,37ml \pm 2,86); GS2 (15,27ml \pm 4,71); GS3 (14,37ml \pm 3,60), no 15° dia de gestação, GC- (16,35ml \pm 5,18); GC+ (15,25ml \pm 3,29); GS1 (14,73ml \pm 3,77); GS2 (16,75ml \pm 3,17); GS3 (15,42ml \pm 2,36) e no 21° de gestação GC- (15,27ml \pm 3,33); GC+ (14,17ml \pm 3,69); GS1 (12,29ml \pm 3,08); GS2 (14,28ml \pm 3,37); GS3 (12,08ml \pm 2,28).

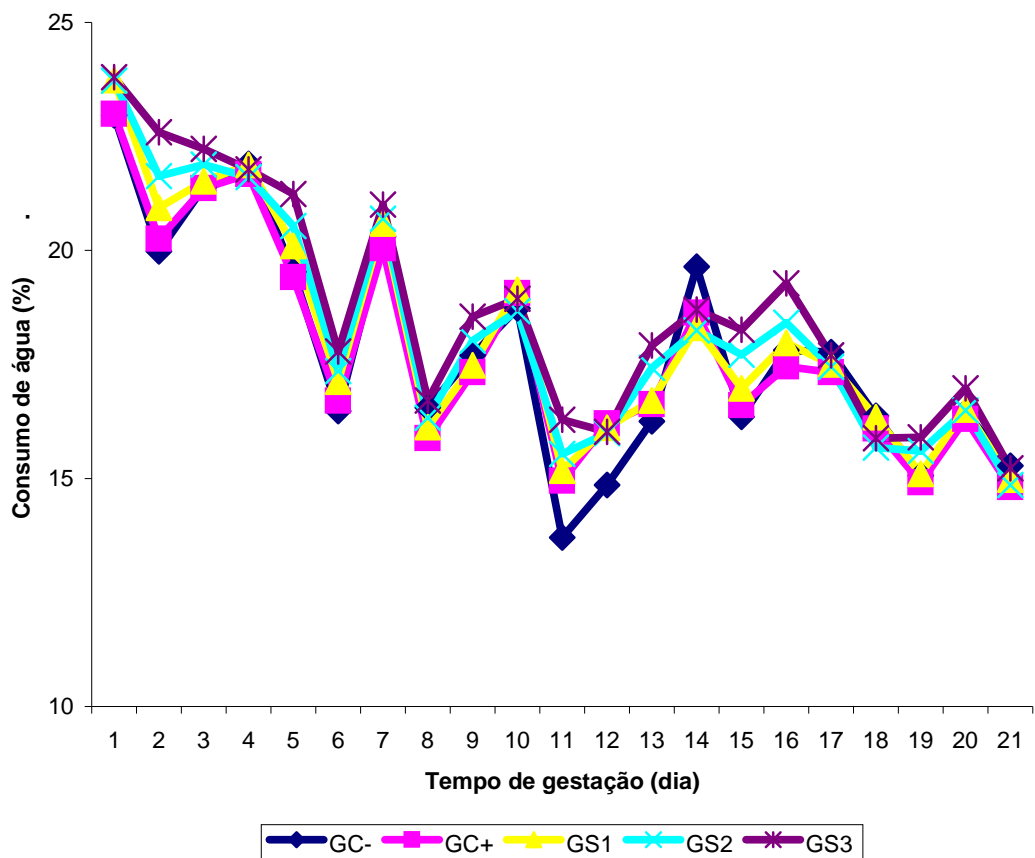


Figura 9. Consumo percentual de água (%) das ratas em relação à massa corporal durante a gestação de fêmeas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6^o ao 15^o dia de gestação. Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 12).

5.1.4 Sinais de toxicidade materna

As fêmeas foram inspecionadas macroscopicamente no momento da laparotomia. Os grupos receberam: (GC-) água destilada 10ml/kg; (GC+) 4,27 mg/kg de isoflavonas de uma mistura semelhante a soja (aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína); (GS1) 1,72 ; (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de isoflavonas de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]), por via oral durante

o período de organogênese (6° ao 15° dia de gestação). A proporção das alterações macroscópicas do útero de fêmeas foi avaliada através do teste Qui-quadrado, sendo possível verificar que não ocorreram na mesma proporção GC- (0/12); GC+ (0/12); GS1 (0/12); GS2 (7/12) e GS3 (9/12), evidenciando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A maior proporção de alterações macroscópicas foi observada na mucosa uterina. A Figura 10 mostra o útero gravídico de uma rata Wistar do grupo GS2, visualizado logo após a laparotomia, evidenciando petéquias na parede uterina. As setas indicam as alterações macroscópicas encontradas logo após a laparotomia.



Figura 10. Útero gravídico de uma rata Wistar do grupo GS2, visualizado logo após a laparotomia, evidenciando petéquias na parede uterina. As setas indicam as alterações macroscópicas encontradas logo após a laparotomia.

A média dos pesos das ninhadas por grupo, mensurados no momento da laparotomia, não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na comparação dos grupos estudados, GC- (72,10g \pm 12,98); GC+ (66,10g \pm 15,51); GS1 (71,64g \pm 12,97); GS2 (63,45g \pm 22,44); GS3 (72,11g \pm 9,75). Não foram observados sinais de aborto, sinais clínicos de toxicidade sistêmica, nem mortalidade durante o período

experimental. A Figura 11 mostra a média do peso das ninhadas (útero gravídico) por grupo, mensurado no momento da laparotomia dos grupos: (GC-) água destilada 10ml/kg; (GC+) 4,27 mg/kg de isoflavonas de uma mistura semelhante a soja (aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína); (GS1) 1,72; (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de isoflavona de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]), por via oral, durante o período de organogênese (6° ao 15° dia de gestação).

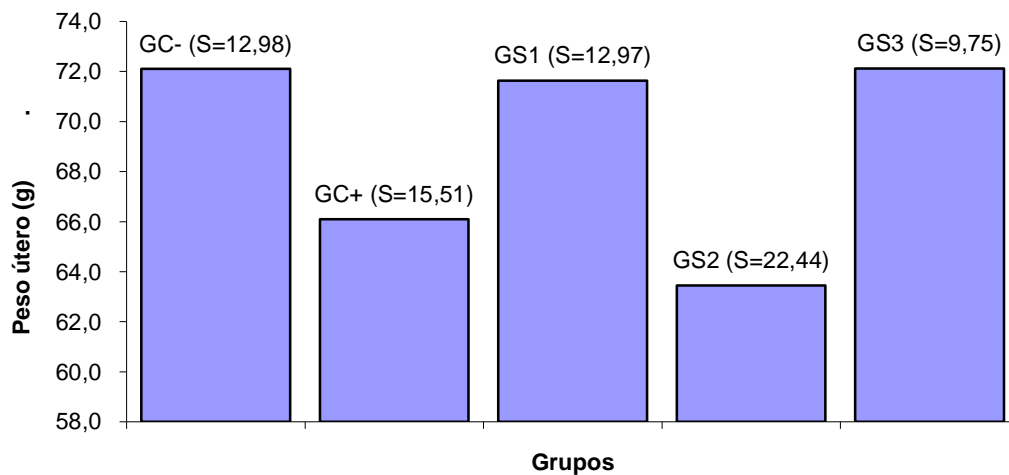


Figura 11. Média do peso das ninhadas (útero gravídico) por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam as médias dos grupos (n = 12). S = desvio padrão.

5.1.5 Perda embrionária pós-implantação

A Figura 12 mostra a média do número de implantes uterinos por grupo, mensurada no momento da cesariana (21 dias de gestação), das fêmeas dos grupos: (GC-) água destilada 10ml/kg; (GC+) 4,27 mg/kg de isoflavonas de uma mistura semelhante a soja (aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína); (GS1) 1,72 ; (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de isoflavonas de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]), por via oral durante o período de organogênese (6° ao 15° dia de gestação). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) no

número de implantes uterinos entre os grupos, GC- ($10,50 \pm 2,02$); GC+ ($10,16 \pm 2,65$); GS1 ($11,08 \pm 1,67$); GS2 ($9,83 \pm 3,73$); GS3 ($11,66 \pm 0,98$).

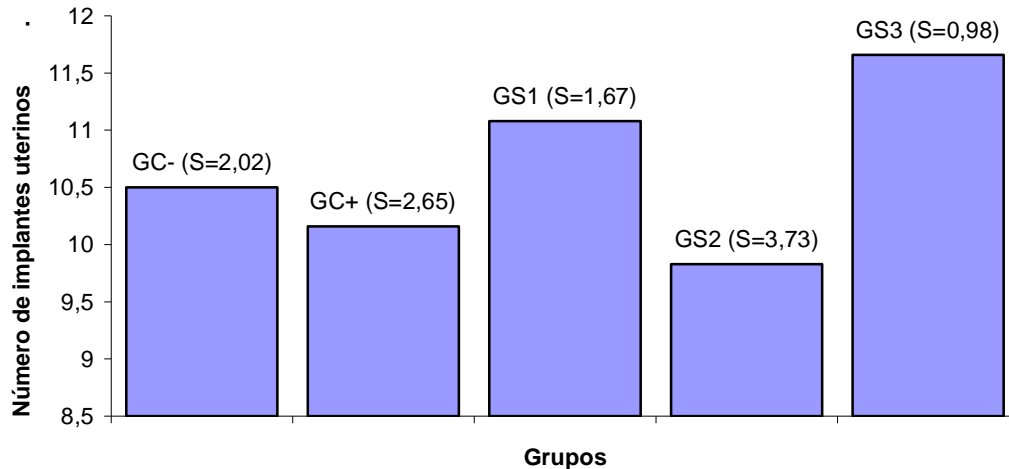


Figura 12. Média do número de implantes uterinos por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam as médias dos grupos (n = 12). S = desvio padrão.

A Figura 13 mostra a média do número de fetos vivos por grupo, mensurada no momento da cesariana (21 dias de gestação), das fêmeas dos grupos: (GC-) água destilada 10ml/kg; (GC+) 4,27 mg/kg de isoflavonas de uma mistura semelhante a soja (aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína); (GS1) 1,72 ; (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de isoflavonas de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]), por via oral durante o período de organogênese (6° ao 15° dia de gestação). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos quando comparado o número de fetos vivos por ninhada, GC- ($10,08 \pm 2,06$); GC+ ($9,75 \pm 2,45$); GS1 ($10,08 \pm 1,67$); GS2 ($9,08 \pm 3,57$); GS3 ($10,08 \pm 1,50$).

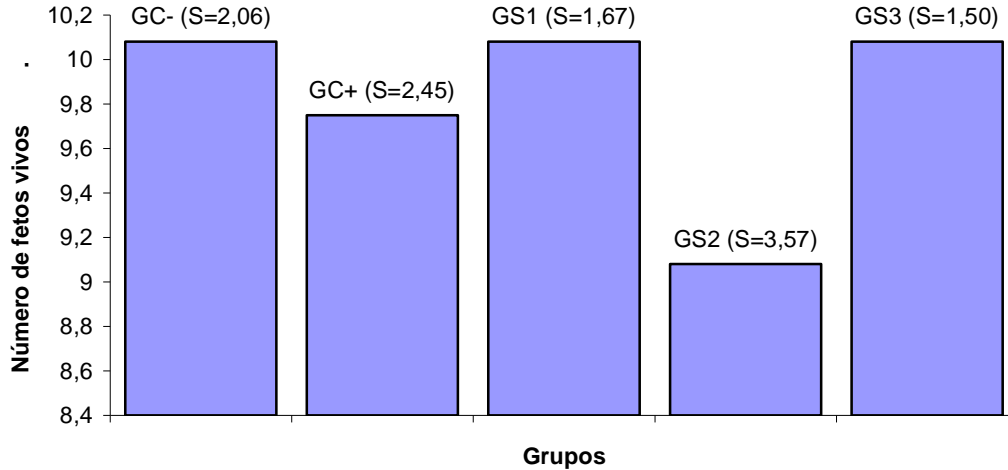


Figura 13. Média de fetos vivos das ninhadas por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6^o ao 15^o dia de gestação. Os valores representam as médias dos grupos (n = 12). S = desvio padrão.

A Figura 14 mostra a percentagem das perdas embrionária pós-implantação (%), mensurada no momento da cesariana (21 dias de gestação). O cálculo foi efetuado a partir do número de implantes uterinos e número de fetos vivos das fêmeas dos grupos: (GC-) água destilada 10ml/kg; (GC+) 4,27 mg/kg de isoflavonas de uma mistura semelhante a soja (aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína); (GS1) 1,72 ; (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de isoflavonas de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]), por via oral, durante o período de organogênese (6^o ao 15^o dia de gestação). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) das perdas pós-implantação entre os grupos, GC- ($3,89 \pm 7,57$); GC+ ($3,58 \pm 7,02$); GS1 ($8,77 \pm 8,90$); GS2 ($7,14 \pm 7,68$); GS3 ($1,77 \pm 15,37$).

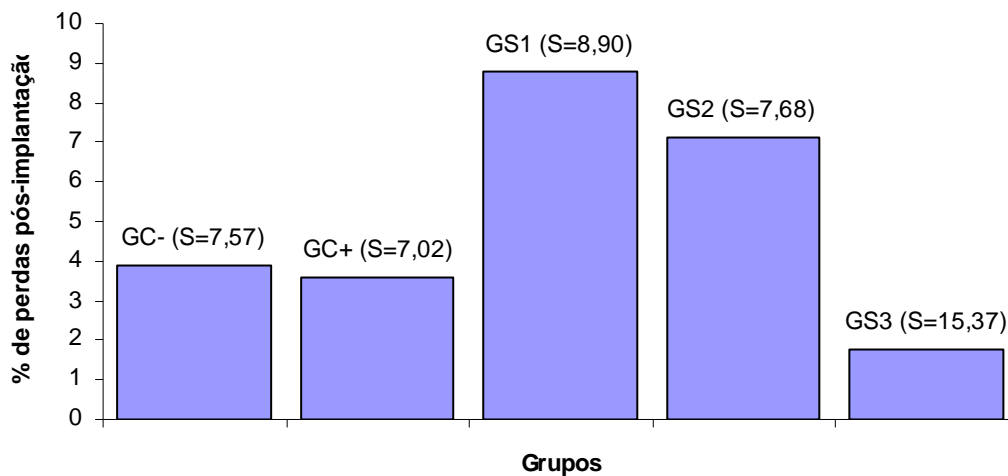


Figura 14. Percentual das perdas pós-implantação por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6^o ao 15^o dia de gestação. Os valores representam as médias dos grupos (n = 12). S = desvio padrão.

5.2 Avaliação da embriofetotoxicidade

5.2.1 Avaliação dos fetos

O estudo da embriofetotoxicidade de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine Max* (L.) Merr durante o período de organogênese, utilizou 590 fetos, sendo GC- (122 fetos), GC+ (117 fetos), GS1 (121 fetos), GS2 (109 fetos) e GS3 (121 fetos). As proporções de fêmeas e de machos não demonstraram diferença estatística significativa ($p > 0,05$), entre os grupos: GC- (74/48); GC+ (63/54); GS1 (57/64); GS2 (58/51); GS3 (57/64). Não foram observados fetos mortos, apenas pontos de implantação com ausência de gestação. A Figura 15 mostra o útero gravídico de uma rata Wistar do grupo GS2, visualizado logo após sua ressecção, evidenciando a presença de um ponto de reabsorção.

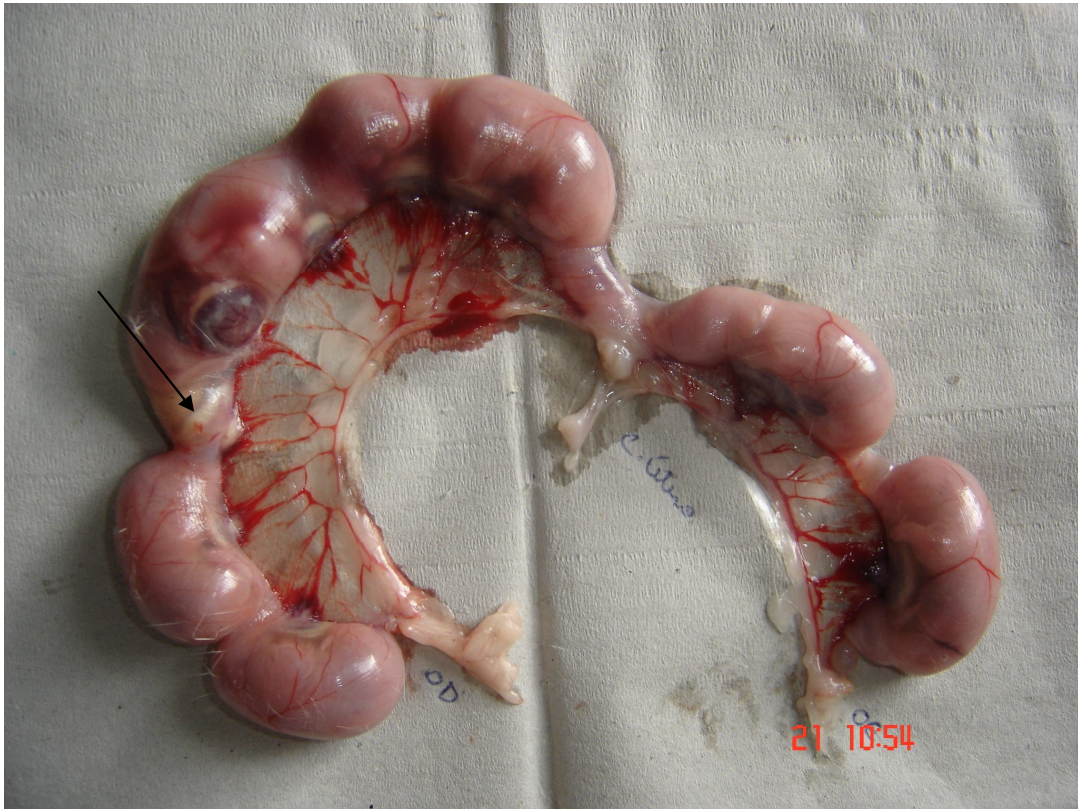


Figura 15. Útero gravídico de uma rata Wistar do grupo GS2. A seta indica a presença de um ponto de implante uterino com ausência de feto.

A Figura 16 mostra a média da massa corporal dos filhotes por grupo, no momento da cesariana (21° dia de gestação), das ratas Wistar dos grupos: (GC-) água destilada 10ml/kg; (GC+) 4,27 mg/kg de isoflavonas de uma mistura semelhante a soja (aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína); (GS1) 1,72 ; (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de isoflavonas de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]), por via oral, durante o período de organogênese (6° ao 15° dia de gestação). Na avaliação do peso corporal individual dos filhotes o grupo GS3 ($4,81 \pm 0,41$), demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação aos demais grupos: GC- ($5,18 \pm 0,44$); GC+ ($5,13 \pm 0,54$); GS1 ($5,00 \pm 0,43$); GS2 ($5,07 \pm 0,67$).

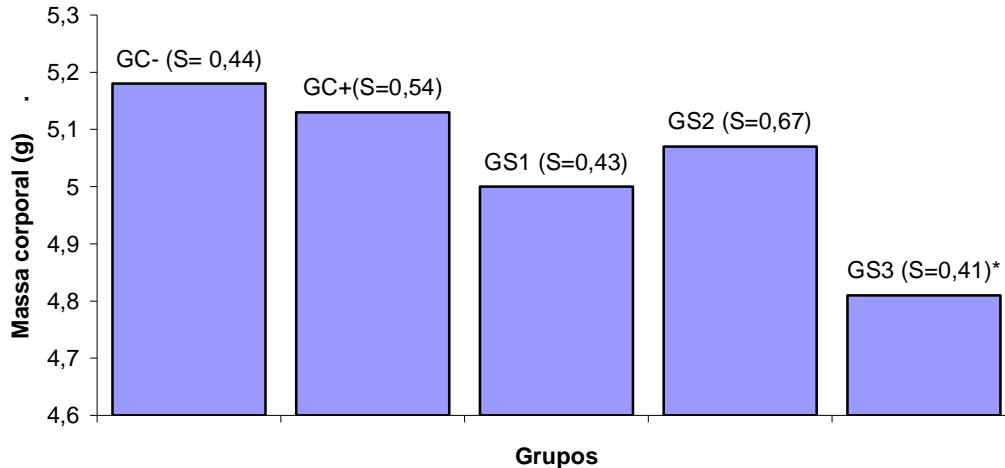


Figura 16. Média da massa corporal individual dos filhotes por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6^o ao 15^o dia de gestação. Os valores representam as médias dos grupos (n = 12). S = desvio padrão. * = diferença estatística significativa em relação aos demais grupos (p<0,05).

5.2.2 Alterações macroscópicas externas

Através do teste estatístico (Qui-quadrado) foi possível verificar que as alterações macroscópicas externas ocorreram na mesma proporção (p>0,05) entre fêmeas (55/311) e machos (51/295). No entanto, o estudo demonstrou que a proporção não é a mesma (p<0,05) entre os grupos: GC- (0/122), GC+ (23/117), GS1 (23/121), GS2 (20/109), GS3 (40/121). A alteração apresentada em todos os casos foi o aparecimento de hematomas cutâneo, na região dorsal da transição da coluna cervical para a coluna torácica, região da sínfise mandibular, face medial dos membros torácicos e a face. A Figura 17 mostra os filhotes de uma rata Wistar do grupo GS3, visualizado logo após a remoção do útero gravídico, evidenciando a presença de hematomas cutâneos.

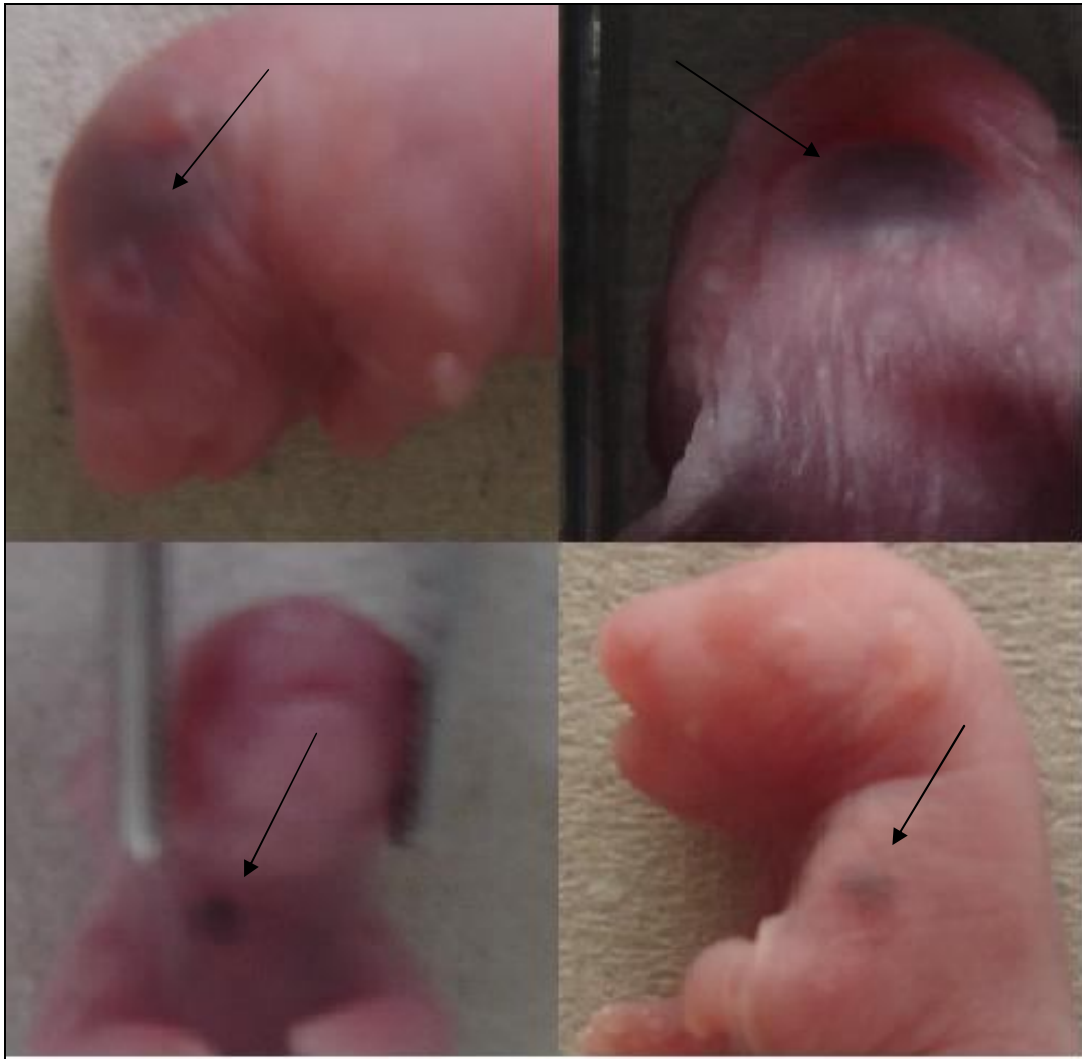


Figura 17. Filhotes de uma rata Wistar do grupo GS3. A seta indica a presença de hematomas cutâneos.

5.2.3 Alterações esqueléticas

A Tabela 1 mostra a percentagem das alterações ósseas encontradas nos fetos examinados por grupo. Os fetos são filhos de ratas dos grupos que receberam: água destilada (GC-), 4,27 mg/kg/dia de uma mistura contendo aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína (GC+), (GS1) 1,72, (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®), por via oral, durante o período de organogênese. As proporções das

alterações esqueléticas identificadas não demonstraram estatisticamente a mesma proporção ($p < 0,05$). Os grupos tratados (GS1, GS2 e GS3) com a formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®), durante o período de organogênese, evidenciaram maior ocorrência de alterações em relação aos grupos controle (GC- e GC+).

TABELA 1. Ocorrência de anomalias ósseas nos fetos (%) por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação. Os valores representam a porcentagem dos grupos.

	GC-	GC+	GS1	GS2	GS3
Fetos examinados	122	117	121	109	121
Fetos com anomalias ósseas (%)	15,57	18,80	35,53*	37,61*	42,14*

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação aos grupos controle.

As alterações ósseas estão discriminadas por região anatômica e tipo de alteração. Os fetos examinados são filhotes de ratas tratadas por via oral, na fase de organogênese, com água destilada (GC-), mistura contendo aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína (GC+), 1,72 mg/kg (GS1), 8,60 mg/kg (GS2) e 17,20 mg/kg (GS3) da formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®).

A Tabela 2 demonstra a ocorrência de malformações, variações e retardos de ossificação dos ossos da cabeça, dos fetos de fêmeas tratadas por via oral com água destilada (GC-), 4,27 mg/kg/dia de uma mistura contendo aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína (GC+), (GS1) 1,72, (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de uma formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®), durante o período de organogênese. Entre os grupos avaliados, os grupos controle (GC- e GC+), evidenciaram o aparecimento de alterações nos ossos da cabeça, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em relação aos demais. A Figura 18 ilustra a fusão entre os ossos pré-maxilar e zigomático de um feto do grupo GC+, corados com vermelho de alizarina e clarificados com o método de coloração adaptado Taylor & Van Dyke (1985).

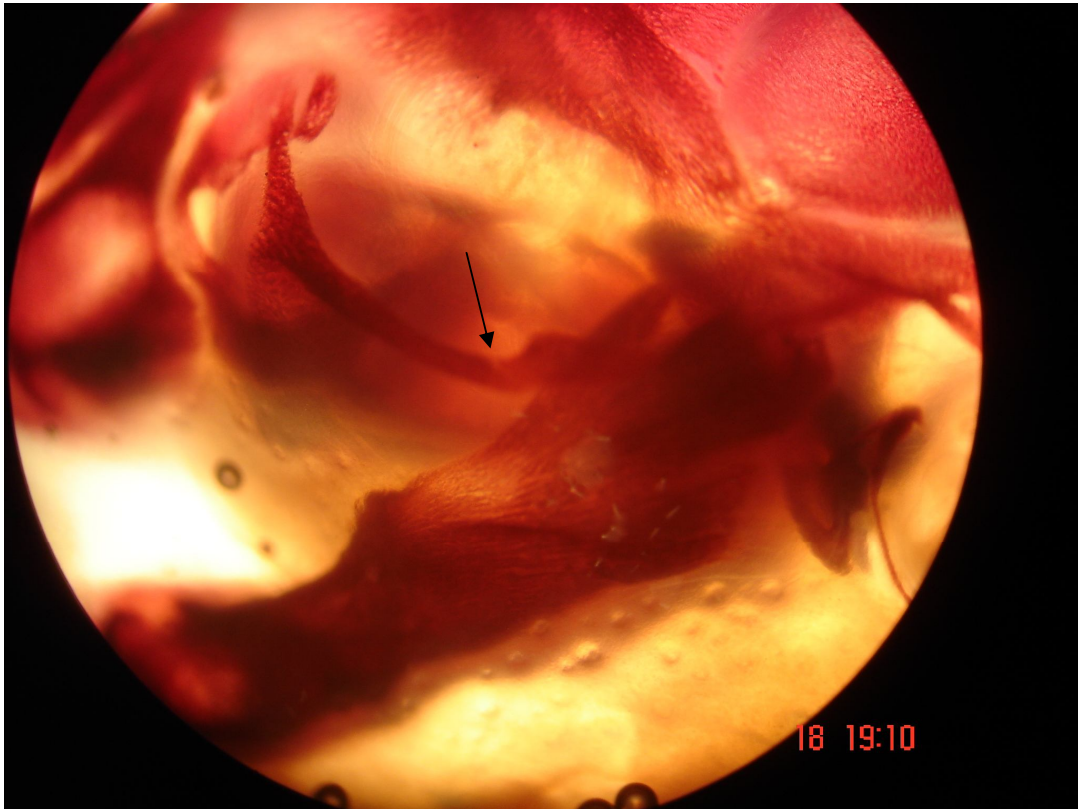


Figura 18. Fusão entre os ossos: pré-maxilar e zigomático, de um feto do grupo GC+, corados com vermelho de alizarina e clarificados com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985). A seta indica o ponto de fusão entre as duas estruturas ósseas.

TABELA 2. Ocorrência de retardos de ossificação e malformações dos ossos da cabeça por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação.

	GC-	GC+	GS1	GS2	GS3
Nasal					
- ossificação insuficiente	0,81	0	0	0	0
Frontal	0	0	0	0	0
Parietal					
- ossificação insuficiente	0,81	0	0	0	0
Interparietal					
- ossificação insuficiente	0,81	0	0	0	0
Supra-occipital	0	0	0	0	0
Pré-maxilar					
- fusão com Zigomático	1,63	0,85	0	0	0
Maxilar	0	0	0	0	0
Zigomático	0	0	0	0	0
Escamoso	0	0	0	0	0
Exoccipital					
- ossificação insuficiente	0,81	0	0	0	0
Volmer	0	0	0	0	0
Palato	0	0	0	0	0
Presfenóide					
- ossificação insuficiente	0,81	0	0	0	0
Basisfenóide					
- ossificação insuficiente	0,81	0	0	0	0
Hámulo	0	0	0	0	0
Basoccipital	0	0	0	0	0
Orbitosfenóide	0	0	0	0	0
Timpânico	0	0	0	0	0

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação aos grupos controle.

A Tabela 3 demonstra a ocorrência de malformações, variações e retardos de ossificação dos ossos da região cervical, tórax, região lombar e pelve, dos fetos de fêmeas tratadas por via oral com água destilada (GC-), 4,27 mg/kg/dia de uma mistura contendo aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína (GC+), (GS1) 1,72, (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de uma formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®), durante o período de organogênese. Os grupos que receberam formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®) foram comparados estatisticamente com os grupos controle (GC- e GC+), evidenciando diferença

estatisticamente significativa ($p < 0,05$), na ocorrência do par de costela supranumerário rudimentar (14° par de costelas).

TABELA 3. Ocorrência de alterações na região cervical, tórax, região lombar e pelve, dos fetos por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6° ao 15° dia de gestação.

	GC-	GC+	GS1	GS2	GS3
Vértebras cervicais	0	0	0	0	0
Clavícula	0	0	0	0	0
Escapula	0	0	0	0	0
Vértebras torácicas					
- centro bipartido	0	0,85	0	0,91	0
Costelas					
- supranumerárias	15,57	18,80	35,53*	37,61*	42,14*
- ausência de costela	0,81	0	0	0	0
- costelas arqueadas	0,81	1,70	0	0,91	0,82
Esterno					
- centro esternal bipartido	6,55	11,11	12,39	13,76	9,92
- ossificação insuficiente de centro esternal	0,81	1,70	4,13	0	0
- ossificação insuficiente do processo xifóide	0,81	0,85	3,30	0	0
Vértebras Lombares					
- centro bipartido	0	0,85	0	0,91	0,82
Ílio	0	0	0	0	0
Ísquio	0	0	0	0	0
Púbis	0	0	0	0	0
Vértebras sacrais	0	0	0	0	0
Vértebras caudais	0	0	0	0	0

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação aos grupos controle.

A Figura 19, ilustra o aparecimento de centro esternal na forma bipartido de um feto do grupo GS2, corado com vermelho de alizarina e clarificado com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985). A Figura 20, ilustra o aparecimento do 14° par de costelas rudimentar e centro de vértebras torácicas e lombares na forma bipartida, evidenciando retardo no desenvolvimento do centro de ossificação, de um feto do grupo

GS3, corado com vermelho de alizarina e clarificado com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985).

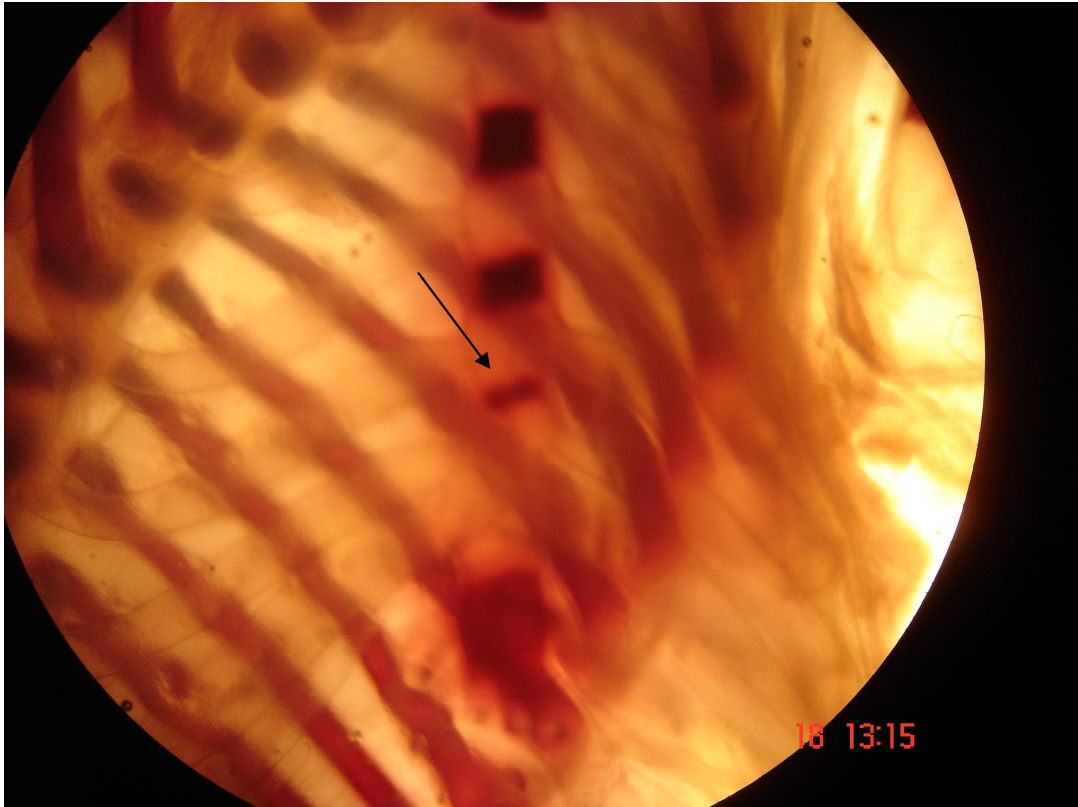


Figura 19. Centro esternal no formato bipartido de um feto do grupo GS2, corado com vermelho de alizarina e clarificado com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985). A seta indica a alteração do formato.

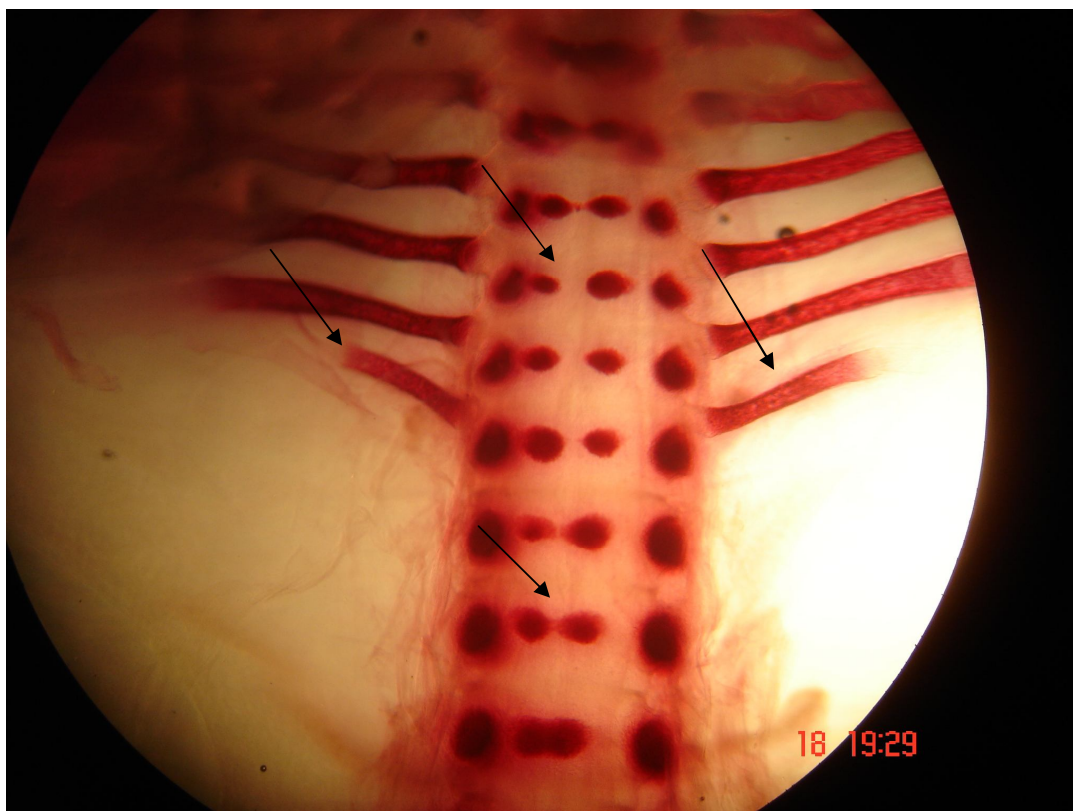


Figura 20. 14^o par de costelas rudimentar e centro de vértebras torácicas e lombares no formato bipartido, de um feto do grupo GS3, corado com vermelho de alizarina e clarificado com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985). As setas indicam as alterações.

A Tabela 4 demonstra a ocorrência de malformações, variações e retardos de ossificação dos ossos dos membros torácicos e pélvicos, dos fetos de fêmeas tratadas por via oral com água destilada (GC-), 4,27 mg/kg/dia de uma mistura contendo aproximadamente 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína (GC+), (GS1) 1,72, (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg de uma formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®), durante o período de organogênese. Não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas na ocorrência de alterações nos ossos dos membros torácicos e pélvicos entre os grupos ($p > 0,05$). A Figura 21, ilustra a ossificação incompleta das falanges do membro torácico de um feto do grupo GS2, corado com vermelho de alizarina e clarificado com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985).

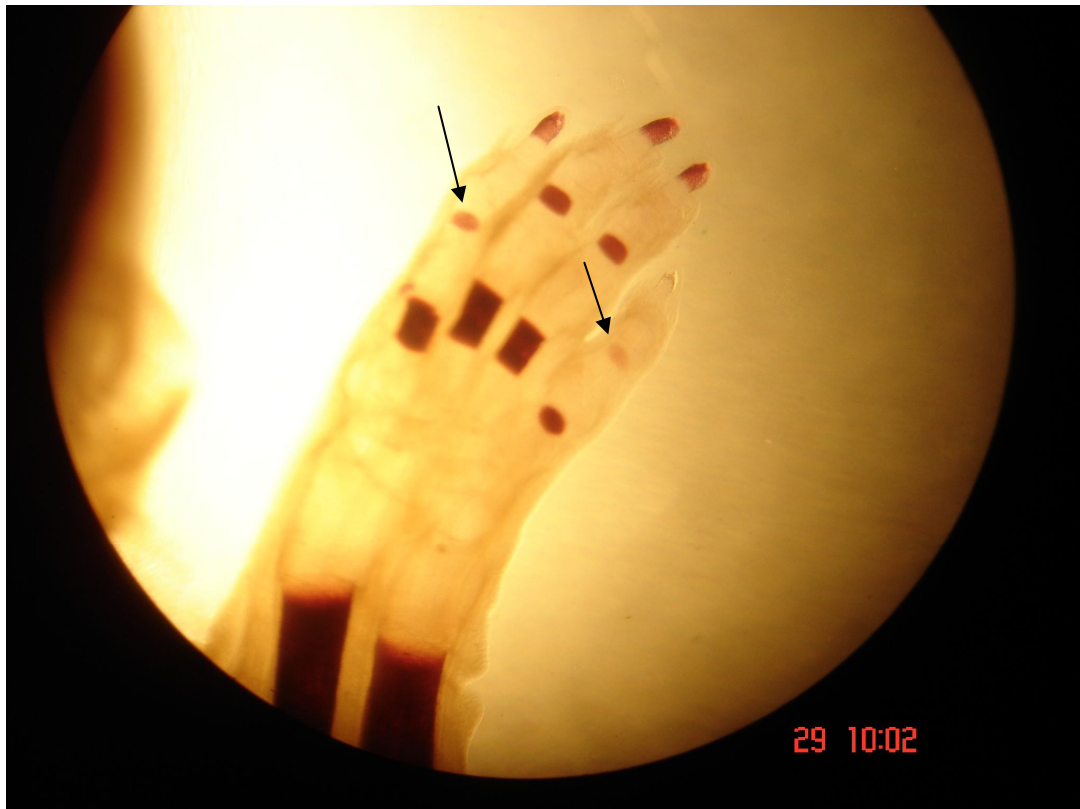


Figura 21. Ossificação incompleta das falanges do membro torácico de um feto do grupo GS2, corado com vermelho de alizarina e clarificado com o método de coloração adaptado por Taylor & Van Dyke (1985). As setas indicam a ossificação incompleta das falanges.

TABELA 4. Ocorrência de malformações, variações e retardos de ossificação dos ossos dos membros torácicos e pélvicos, dos fetos por grupo, das ratas tratadas com uma formulação fitoterápica contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]) com três diferentes doses (GS1, GS2 e GS3), água destilada (GC-) e isoflavonas (GC+), do 6^o ao 15^o dia de gestação.

	GC-	GC+	GS1	GS2	GS3
Úmero	0	0	0	0	0
Rádio	0	0	0	0	0
Ulna	0	0	0	0	0
Metacarpos					
- ossificação insuficiente	2,45	2,56	2,47	2,75	2,47
Falanges (MT)	7,35	7,68	7,41	8,25	6,61
- ossificação insuficiente					
Fêmur	0	0	0	0	0
Tíbia	0	0	0	0	0
Fíbula	0	0	0	0	0
Metatarsos					
- ossificação insuficiente	12,29	9,40	9,91	11,01	7,43
Falanges (MP)	13,11	11,96	12,39	12,84	9,91
- ossificação insuficiente					

MT: membro torácico; MP: membro pélvico.

6. DISCUSSÃO

A soja e seus constituintes foram consumidos em níveis elevados, por várias populações asiáticas durante séculos, sem qualquer efeito adverso aparente. Entretanto, a preocupação levantada a partir dos potenciais efeitos adversos da atividade estrogênica das isoflavonas, recomenda diversos estudos de segurança com o uso das formulações fitoterápicas comerciais, contendo *Glycine max* (L.) Merr (McCLAIN et al., 2006).

Os principais fitoestrógenos são os encontrados na soja (CLAPAUCH et al., 2002). As isoflavonas (genisteína, daidzeína e gliciteína), por sua semelhança funcional ao estrógeno humano, determinam efeitos estrogênicos importantes, sendo por isso referidos como fitoestrógenos (WANG & MURPHY, 1994). Os fitoestrógenos mais encontrados nas dietas são as isoflavonas, as quais estão presentes, principalmente, em produtos à base de soja (LIGGINS et al., 2000).

No Brasil, a Resolução 90/04 (*Diário Oficial* 16/03/04) do conselho Nacional de Saúde estabelece, estudos de toxicologia pré-clínica, para registro e renovação de registro de fitoterápicos, cinco tipos de ensaios de toxicidade: aguda, subaguda, crônica, teratogenia e embriotoxicidade e estudos especiais. O estudo da teratogenia e embriotoxicidade foi desenvolvido baseado em normativas internacionais, de acordo com o produto a ser testado.

O protocolo elaborado, utiliza o segmento II (pré-natal) que abrange o período de organogênese (6° a 15° dia de gestação – ratas Wistar) de acordo com Mello & Langeloh (2006) e Lemonica (2008). O segmento II constitui um dos três segmentos dos estudos de toxicologia reprodutiva, conforme normas internacionais da EPA (*Environmental Protection Agency*) e recomendações do FDA (*Food and Drug Administration*) e da OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*).

Nas últimas décadas, tem havido um grande interesse nos fitoterápicos e em particular nos potenciais benéficos que uma dieta rica nestes compostos pode conferir no controle de muitas doenças crônicas. O maior interesse é na farmacologia e fisiologia das isoflavonas, pois apresentam uma estrutura não esteroideal, mas comporta-se como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, além de serem as mais abundantes dentre os

fitoestrógenos. Em adição à sua atividade estrogênica, estes compostos possuem diversas propriedades biológicas (atividade antioxidante, inibição da atividade enzimática e outras) que podem influenciar muitos processos bioquímicos e fisiológicos (ESTEVEZ & MONTEIRO, 2001).

Informações têm relacionado o aparecimento de deformidades/anomalias morfológicas em seres humanos, especialmente hipospádia, aos hábitos vegetarianos. Além de pesticidas e fertilizantes artificiais utilizados sobre os vegetais, os fitoestrógenos são indicados como possíveis responsáveis pela elevada incidência de deformidades, maior em filhos de pais vegetarianos (SOYONLINESERVICE–www.soyonlineservice.co.nz/index.htm).

McClain et al. (2007), realizaram um estudo piloto em ratas Wistar, com uma suspensão oral contendo genisteína, administrada diariamente no período do 6º ao 20º dia de gestação. Foram testadas as doses: 0, 20, 150 e 1000 mg/kg/dia de genisteína. Na maior dose testada 1000 mg/kg/dia, foi observado o menor ganho de peso das ninhadas durante o período de lactação. Na dose intermediária de 150 mg/kg/dia e na dose de 1000 mg/kg/dia ocorreram alguns óbitos, com menor média do peso corporal individual ao nascer e diferença estatística em relação aos demais grupos.

No mesmo estudo foram observadas as reduções da distância anogenital em fetos machos na avaliação macroscópica externa e alterações viscerais tais como: hipoplasia do timo e ausência de epidídimo e testículo, displasia renal, hipoplasia testicular e ausência de artérias.

Na avaliação esquelética foram observadas anomalias no esterno, costelas e ossificação incompleta. No entanto, até o momento, não há relatos de que uma formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr atue de forma direta sobre a embriogênese durante o tratamento, no intervalo do 6º a 15º dia da gestação em ratas Wistar.

O presente trabalho mostrou que as três doses (1,72 (GS1); 8,60 (GS2) e 17,20 (GS3) mg/kg/dia) da formulação fitoterápica comercial (Soyfemme®) administradas, diariamente, por via oral, em ratas Wistar, durante o período de organogênese (6º a 15º dia de gestação), interferiram no desenvolvimento ponderal, no consumo de ração e na proporção das alterações macroscópicas do útero das progenitoras. Bem como interferiu na

média de peso individual, na proporção das alterações macroscópicas externas e na proporção das variações e retardos de ossificação, das progênes.

A toxicidade sistêmica é manifestada através de alterações no desenvolvimento ponderal dos animais, redução no consumo de ração e água e alterações comportamentais como prostração, apatia e presença de pelos arrepiados (MELLO, 2001). A formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme[®]), em relação ao consumo de água não evidenciou diferença estatisticamente significativa durante todo o período avaliado entre os grupos (GC-, GC+, GS1, GS2 e GS3).

Durante a fase prévia ao tratamento (período de implantação), as fêmeas apresentaram curvas de desenvolvimento ponderal e de consumo de ração semelhantes, com todas apresentando um ganho de massa corporal semelhante. No 15º dia, as fêmeas que receberam (GS2) 8,60 mg/kg/dia demonstraram menor ganho de massa corporal em relação aos demais grupos. Também as fêmeas que receberam (GS2) 8,60 mg/kg/dia, demonstraram menor ganho de massa corporal e redução no consumo de ração, no momento da laparotomia, em comparação aos grupos controle (GC- e GC+). Desta forma, sugere-se que o fitoterápico pode interferir na gestação de ratas Wistar.

As médias do peso das ninhadas, do número de implantes uterinos, do número de fetos vivos e da percentagem das perdas pós – implantação não foram afetados, sendo semelhante nos três grupos tratados (GS1, GS2 e GS3) e nos grupos controle (GC- e GC+), mensurados no momento da cesariana. Não foram observados, também, sinais de aborto e nem mortalidade durante o período experimental.

Segundo Bernardi (1999), os agentes teratogênicos sempre produzem suas ações por interferirem nos mecanismos celulares, em doses que causam nenhuma ou mínima toxicidade materna; desde que se pretenda estudar os efeitos na prole e não aqueles ligados à toxicidade materna. McClain (2007) atribui toxicidade materna sistêmica (redução do ganho de massa corporal) às elevadas doses (500 e 1000 mg/kg/dia) de solução oral de genisteína.

Outro sinal de toxicidade materna foi o aparecimento de alterações macroscópicas no útero das fêmeas que receberam (GS2) 8,60 e (GS3) 17,20 mg/kg/dia, identificadas logo após a cesariana. As alterações macroscópicas foram observadas como petéquias na mucosa uterina. As plaquetas participam na formação da rolha hemostática, em casos de lesão do

endotélio vascular (NAHÁS et al., 2003). Segundo Schoene & Guirdry (1999), a genisteína também apresenta efeito sobre a supressão da formação de trombo por inibir a ativação, o recrutamento e a agregação plaquetária.

Os fetos foram expostos aos tratamentos durante o período de organogênese. Na rata o período de organogênese corresponde ao intervalo do 6° ao 15° dia de gestação. Segundo Lemonica (2008), as anomalias morfológicas nos fetos ocorrem na gestação no período da organogênese, fase mais vulnerável do desenvolvimento embrionário.

A exposição ao fitoterápico (Soyfemme®) não determinou diminuição na taxa de natalidade, diferença na proporção de sexo quando comparados os grupos (GC-, GC+, GS1, GS2 e GS3). Entretanto, houve diferença na média de massa corporal individual dos filhotes, sendo que a maior dose (GS3) 17,20 mg/kg/dia, apresentou ganho inferior aos demais grupos (GC-, GC+, GS1 e GS2). O mesmo não foi evidenciado pelo estudo piloto com as doses 0, 20, 150 e 1000 mg/kg/dia, o qual não apresentou diferença na massa corporal dos filhotes no momento da cesárea (McCLAIN et al., 2007).

Os estudos mostraram que a genisteína pode causar retardamento do ciclo celular e alterações no desenvolvimento do embrião. O efeito parece estar ligado à inibição de enzimas como a tiroxina proteína quinase (JACQUET et al., 1995) e do receptor do fator de crescimento (EGF), reduzindo o efeito positivo do EGF no incremento da glicose. Sendo a glicose a principal fonte de energia exógena para o desenvolvimento do embrião na pré-implantação, esperar-se-ia afetar dramaticamente o desenvolvimento embrionário (HEO & HAN, 2006).

Bogoliubova (1999), sugere que a genisteína pode inibir o desenvolvimento embrionário alterando a estrutura e a função mitocondrial. Entretanto, os estudos indicam que o efeito inibitório da genisteína no desenvolvimento embrionário é devido a inibição da tiroxina proteína quinase “*in vitro*”, na fase de pré-implantação.

As má-formações externas são referidas como as alterações detectadas macroscopicamente antes do processo de diafanização. Não foram visualizadas alterações macroscópicas externas na conformação craniana, implantação das orelhas, palato, conformação da cauda e nas patas e perfuração anal. Entretanto, foram identificados hematomas cutâneos nos grupos tratados, (GS1, GS2 e GS3) e também no grupo controle

(GC+) que recebeu uma mistura contendo 45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliciteína.

No grupo controle (GC-) que recebeu água destilada, não houve alterações macroscópicas externas. A maior proporção de alterações foi notada no grupo de maior dose (GS3) 17,20 mg/kg/dia. A proporção de alterações ocorreu de forma semelhante entre os sexos não havendo diferença entre eles.

Conforme McClain et al. (2007) a redução do espaço anogenital é um indicativo da atividade estrogênica, porém no presente estudo não foi avaliada tal característica. Entretanto, a redução da função plaquetária da genisteína (SCHOENE & GUIRDY, 1999), pode explicar a ocorrência do aparecimento de hematomas cutâneos pela atividade da isoflavona.

Quanto maior for o período de formação de um determinado sistema, maior será o risco de seu desenvolvimento ser afetado por um determinado agente. Por isso, nos testes de teratogenicidade são estudadas as possíveis anomalias ósseas dos animais, pois o período de organogênese do esqueleto é bastante longo (BERNARDI, 1999).

Referentes às alterações esqueléticas diagnosticadas, os grupos que receberam o fitoterápico (GS1, GS2 e GS3) apresentaram um aumento geral de alterações esqueléticas observadas, demonstrando diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos controle (GC- e GC+). Entretanto, em relação aos grupos controle (GC- e GC+), as alterações esqueléticas foram semelhantes.

Entre os grupos avaliados, os grupos controle (GC- e GC+) evidenciaram o aparecimento de alterações nos ossos da cabeça, porém sem diferença em comparação aos grupos tratados (GS1, GS2 e GS3). Houve, também, o aparecimento de ossificações incompletas dos ossos: nasal, parietal, interparietal, exoccipital, presfenóide e basisfenóide.

Segundo Lork (1977), os retardos do desenvolvimento ósseo estão relacionados com a ausência dos centros de ossificação em estruturas bilaterais ou na presença de forma e/ou tamanho claramente sugestivos de um estágio precoce de desenvolvimento. Inclui-se na classificação de retardos do desenvolvimento do esqueleto as ossificações incompletas dos ossos do crânio, conforme o estudo realizado.

No estudo “*in vitro*” com cultura embrionária as amostras foram expostas a concentrações diferentes de genisteína 0, 3, 10, 30 e 100 µg/ml. Onde as dose ≤ 10 µg/ml

determinaram anormalidades. As doses 10 µg/ml e 30 µg/ml foram responsáveis pelo aparecimento de embriões com desenvolvimento inferior. Na dose 100 µg/ml todos os embriões desenvolveram malformações, sinais de embriotoxicidade e baixo desenvolvimento em relação as demais doses (McCLAIN et al., 2007).

Também nos ossos da cabeça apareceram má-formações através da fusão dos ossos pré-maxilar e zigomático. Lork (1977), classifica as má-formações do esqueleto, pela ausência parcial ou total de ossos importantes, encurtamentos, arqueamentos, assimetrias, fusões, fendas ou duplicidade.

Os resultados obtidos no presente trabalho não revelaram alterações esqueléticas na região cervical, lombar e pélvica dos fetos de fêmeas tratadas com o fitoterápico (GS1, GS2 e GS3) e os grupos controle (GC- e GC+). Entretanto, a região do tórax evidenciou a ocorrência de retardos do desenvolvimento do esqueleto conforme Lork (1977), por meio do aparecimento de ossificação insuficiente de centros esternais e do processo xifóide e também, pela forma sugestiva de um estágio precoce de desenvolvimento com o centro de vértebra torácica e centros esternais bipartidos.

A análise da proporção da alteração de maior ocorrência, 14° par de costelas rudimentares, foi semelhante nos grupos tratados (GS1, GS2 e GS3), com uma formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®), porém apresentou diferença significativa em relação a ocorrência nos grupos controle (GC- e GC+).

Conforme Solecki (2001), o termo supranumerário indica uma má-formação; contrariando o sugerido por Neubert et al. (1996), que considera variações o aparecimento de costelas supranumerárias (14° par) em ratos, mesmo quando ocorrido de forma rudimentar (vestígios).

Houve um grande percentual de não ossificação das falanges tanto dos membros torácicos e pélvicos, quanto dos metacarpos e metatarsos. De acordo com Lork (1977), as falanges terminais dos ratos normalmente estão ausentes aos 21 dias de gestação, devido à ausência de centros de ossificação.

A ossificação incompleta no rato, geralmente indica atraso de desenvolvimento, independente da estrutura afetada. Contudo, pode ser classificada como uma variação, se o mesmo ocorrer em amostras controle de mesma idade (SOLECKI, 2001).

Em estudo piloto, a suspensão oral com genisteína foi administrada no período do 6° ao 20° dia de gestação de ratas. Foram testadas as doses: 0, 20, 150 e 1000 mg/kg/dia de genisteína. No estudo não foi observado nenhum feto malformado na avaliação macroscópica externa. Na avaliação esquelética foram observados anomalias no esterno, costelas e ossificação incompleta (McCLAIN, 2007), resultados também evidenciados no presente estudo.

Conforme Roucourt & Stancati (2002), o retardo de crescimento fetal é de etiologia múltipla, existindo diversos fatores envolvidos em sua gênese, tais como alterações genéticas, estruturas maternas, altitudes elevadas, nutrição materna, hábitos e vícios, uso de medicações, exposição a radiação ionizante, patologias maternas, gemelaridades, alterações placentárias e fatores paternos. As consequências do retardo de crescimento fetal, em virtude das alterações biométricas e funcionais inerentes à mesma, determinam sequelas variáveis podendo ser até mesmo morte do concepto.

Segundo Lemonica (2008), uma das razões para que existam respostas diversas entre mãe, feto e substância química, é que a resposta ao agente teratogênico é amplamente dependente do genótipo do embrião, e dentro da mesma espécie, pode-se encontrar sensibilidade diferente a um mesmo teratógeno. Essa diferença inter e intraespécie faz com que apesar das inúmeras pesquisas na área poucas substâncias tenham sido reconhecidas até o momento como teratógenos. Outro fato que determina o aparecimento de efeito embriotóxico de uma substância química é a interação entre essa substância e outros fatores que incidem sobre o organismo materno tais como estado nutricional, fatores ambientais, idade materna e estresse.

A prevalência de má-formações esqueléticas nos fetos foi muito baixa neste trabalho e não apresentou uma relação dose – dependente. A identificação de costelas supranumerárias foi a única alteração esquelética estatisticamente significativa encontrada em relação ao grupo-controle, que pode ser considerada uma variante (considerando formas vestigiais).

Assim sendo, tornam-se necessários estudos complementares para a comprovação destes dados; bem como a determinação de novas dosagens e testes em outras espécies. Além das alterações esqueléticas poderão ser avaliadas, também, as alterações viscerais e comportamentais dos fetos.

7. CONCLUSÕES

A administração de uma formulação fitoterápica comercial contendo *Glycine max* (L.) Merr (Soyfemme®), em ratas Wistar, durante o período de organogênese fetal, pode induzir toxicidade materna sistêmica leve e determinar diminuição no ganho de massa corporal individual dos filhotes nascidos por ninhada, resultando em retardo dos centros de ossificação e aumento das variantes.

Os resultados evidenciaram que somente o grupo que não recebeu o fitoestrógeno não sofreu prejuízos reprodutivos, demonstrando a melhor performance no ganho de peso embrionário e ausência de hematomas cutâneos na prole. Também, não obteve déficit no ganho de massa corporal, consumo de ração e ingestão de água e manifestações de distúrbios no trato reprodutivo nas fêmeas, quando comparado com os demais grupos, sugerindo que a preparação comercial fitoterápica contendo soja *Glycine max* (L.) Merr 40% pode interferir na gestação de fêmeas tratadas no período organogênico, resultando em embriofetotoxicidade.

Desta forma, é importante a execução de novos estudos de segurança, com a finalidade de buscar mecanismos específicos para esses achados e determinar novas dosagens e testes em outras espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, D. L.; SILVA, C. R. **Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal**. São Paulo – Editora Atheneu, 2002, 105p.
- ANDERSON, J. J. B., GARNER, S.C. Phytoestrogens and human function. **Nutrition Today**, v.32, n.6, p.232-239, 1997.
- BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 26, p. 921 – 926, 2006.
- BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, 3º ed. p. 59 –71, 2008.
- BERNARDI, .M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2º ed., p. 566 – 574, 1999.
- CAI, Q.; WEI, H. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in mice. **Nutr Cancer**, v. 25, p. 1 – 7, 1996.
- CHUNG, T. K.; YIP, S. K.; LAM, P.; CHANG, A. M.; HAINES,C. J. A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study on the effect of oral oestradiol on acute menopausal women. **Maturitas**, v. 25,p. 115 –123, 1996.
- CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R. M. R.; JULIÃO, M. A. S. G.; LOUREIRO, C. K. C.; GIARODOLI, P. B.; PINHEIRO, S. A.; HARRIGAN, A. R.; SPRITZER, P. M.; PARDINI, D. P.; WEISS, R. V.; ATHAYDE, A.; RUSSO, L. A.; POVOA, L. C. Fitoestrogênios: posicionamento do departamento de endocrinologia feminina da sociedade brasileira de endocrinologia e metabologia. **Arq Brás Endocrinol Metab**, v. 46, nº 06, p. 679 - 695, 2002.
- CLAPAUCH, R.; ATHAYDE, A.; MEIRELLES, R. M. R.; WEISS, R. V.; PARDINI, D. P.; LEÃO, L. M. C. S. M.; MARINHEIRO, L. P. F. Terapia Hormonal da menopausa: posicionamento do departamento de endocrinologia feminina e andrologia SBEM em 2004. **Arq Brás Endocrinol Metab**, v. 49, n. 03, p. 449 – 454, 2005.
- COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2º ed., São Paulo, H. A. Rothschild, 259 p., 1996.
- COOPER, C.; CAMPION G.; MELTON, L. J. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. **Osteoporos Int**, v. 2, p. 285 – 289, 1992.
- DAVIS, S. R. Phytoestrogen therapy for menopausal symptoms?. **BMJ**, v. 323, p. 354 – 355, 2001.

-EMBRAPAA. Consumo diário de soja pode garantir saúde e vida longa. <http://www.EMBRAPA.br/imprensa/noticias/2002/junho/bn.2004-11-25.2513155615/?searchterm=soja> acesso em 20 de dezembro de 2008.

-EMBRAPAb. Soja é um alimento nutritivo e saudável. <http://www.EMBRAPA.br/imprensa/noticias/2003/setembro/bn.2004-11-25.7835094392/?searchterm=soja> acesso em 20 de dezembro de 2008.

-EMBRAPA. 4ª Conferência Internacional de Processamento e Utilização de Soja (ISPUC) e o 3º Congresso Brasileiro de Soja (CBS). <http://www.EMBRAPA.br/imprensa/noticias/2004/janeiro/bn.2004-11-25.6208455512/?searchterm=produção%20da%20soja%20mundo> acesso em 21 de dezembro de 2008.

-ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos Benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Rev Nutr**, v. 14, n. 01, p. 43 – 52, 2001.

-FOLMAN, Y.; POPE, G. S. The interection in the immature mouse of the potent oestrogens with coumestrol, genistein and other utero-vaginitrophic compounds of low potency. **J Endocrinol**, v.34, p 215 – 225, 1966.

-FITZPATRICK, M. Soya in baby milks. **Pract Midwife**, v.2, p. 38, 1999.

-GENUTH, S. M. O sistema endócrino. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed., p. 910 – 956, 2000.

-GLAZIER, M.G., BOWMAN, M. A. A review of the evidence for the use of phytoestrgens as a replancement for traditional estrogen replacement therapy. **Arch Intern Med**, v. 161, p. 1161 – 1172, 2001.

-HALE, G. E., HUGHEES, C.L., CLINE, J. M. Endometrial cancer: hormanal factors, the perimenopausal “window of risk”, and isoflavones. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, p. 3 – 15, 2002.

-JOHNSON, E. B.; MUTO, M. G.; YANUSHPOLSKY, E. H. MUTTER, G. L. Phytoestrogen supplementation and endometrial cancer. **Obstet Gynecol**, v. 98, p. 947 – 950, 2001.

-LEMONICA, I. P. Toxicologia da reprodução. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, 3º ed. p. 59 – 71, 2008.

-LIGGINS J, BLUCK LJ, RUNSWICK S, ATKINSON C, COWARD WA, BINGHAM SA. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **J Nutr Biochem**, v. 11, p. 326 – 331, 2000.

-LIVINALLI, A.; LOPES, L. C. Avaliação das prescrições de isoflavonas para mulheres no climatério em cidade de médio porte do Estado de São Paulo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 185 – 191, 2007.

- LORK, D. Evaluation of Skeleton. In: NEUBERT, D.; NERKER, H. J.; KAWASIGROCH, T. E. Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 474 p., 1977.

-KNIGHT, D. C.; EDEN, J. A. Phytoestrogens – a short review. **Maturitas**, v. 22, p. 167 – 175, 1995.

-MAGGIOLINI, M., BOOFIGLIO, D., MARSICO, S., PANNO, M. L. CENNI, B., PICARD, D. Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. **Mol Pharmacol**, v. 60, p. 595 – 602, 2001.

-MASKARINEC, G. SINGH, S. MENG, L. FRANKE, A. A. Dietary soy intake and urinary isoflavone excretion among women from a multiethnic population. **Cancer Epidemiol Bio-markers Prev**, v. 7, p. 613 – 629, 1998.

-McCLAIN, R. M.; WOLZ, E.; DAVIDOVICH, A.; PFANNKUCH, F.; EDWARDS, J. A.; BAUSCH, J. Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats. **Food and Chemical Toxicology** v. 44, p. 56 – 80, 2006.

-McCLAIN, R.M. ; WOLZ, E.; DAVIDOVICH, A.; EDWARDS, J.; BAUSCH, J. Reproductive safety studies with genistein in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1319 – 1332, 2007.

-MELLO, F. B. Estudos dos efeitos de *Lantana câmara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos. 2001. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

-MELLO, J. R. B.; LANGELOH, A. Avaliação da toxicidade reprodutiva e teratogenicidade. In: RHODEN, E. L.; RHODEN, C. R. Princípios e técnicas em experimentação animal. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 455 – 464, 2006.

-MORITO, K., AOMORI, T., HIROSE, J., HASEGAWA, J., OGAWA, S. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. **Biol Pharm Bull**, v. 25, p. 48 – 52, 2002.

-MUELLER, S. O. Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. **Journal of Chromatography**, v. 77, p. 155 – 165, 2002.

-NAFTOLIN, F., STANBURY, S. M. Phytoestrogens: are they really estrogen mimics?. **Fertil Steril**, v. 77, p. 15 – 27, 2002.

-NAHAS, E. A. P., NAHAS, J. N., LUCA, L.A., TRAIMAN, P., PONTES, A., DALBEN, I. Efeitos da isoflavona sobre os sintomas climatéricos e o perfil lipídico na mulher em menopausa. **RBGO**, v. 25, n° 5, p. 337 – 343, 2003.

-NEUBERT, D.; KAVLOCK, R. J.; MERKER, H. J.; KLEIN, J. Risk assesement of prenatally – induced adverse health effects. Berlin; Springer – Verlag, 565 p., 1996.

-SOLECKI, R. Harmonisation of rat fetal skeletal termonilogy and classification report of the third workshop on the terminology in development toxicology. **Reproductive Toxicology**. v. 15, n° 6, p. 713 – 721, 2001.

-NEWBOLD, R. R.; BANKS, E. P.; BULLOCK, B.; JEFFERSON, W. N. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. **Cancer Res**, v. 61, p. 4325 – 4328, 2001.

-NORTH, K.; GOLDING, J. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. **BJU Int**, v. 85, p. 107 –113, 2000.

-PATISAUL, H. B.; DINDO, M.; WHITTEN, P. L. YOUNG, L. J. Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor alpha and beta dependent gene expression in the brain. **Endocrinology**, v. 142, p. 2946 –2952, 2001.

-PATISAUL, H. B.; MELBY, M.; WHITTEN, P. L. YOUNG, L. J. Genistein affects ER beta but not ER alpha dependent gene expression in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 143, p. 2189 – 2197, 2002.

-PETERSON, T. G., JI, G. P., KIRK, M., COWARD, L., FALANY, C. N., BARNES, S. Metabolism of the isoflavones genistein and biochanin A in human breast cancer cell lines. **Am J Clin Nutr**, v. 68, p. 1505 – 1511, 1998.

-POTTER, S. M.; BAUM, J. A.; TENG, H. Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 06, p. 1375 –1379, 1998.

-QUEIROZ, S. C. N. A importância dos fitoestrógenos, presentes na soja, para a saúde humana.
http://www.agencia.cnptia.EMBRAPA.br/recursos/Queiroz_Nogueira_Scramin_importanci aID-5nX98pWTxk.pdf acesso em 25 de dezembro de 2008.

-SACKS, F. M.; LICHTENTEIN, A.; VAN HORN, L.; HARRIS, W.,; KRISETHERTON, P.; WINSTON, M. Soy protein, Isoflavones, and cardiovascular health: An American HeartAssociation Science Advisory for Professional From the Nutrition Committee. **Journal of American Heart Association**. v. 113, p. 1034 – 1044, 2006.

-SCHOENE, N. W.; GUIRDY, C. A. Dietary soy isoflavone inhibit activation of rat platelets. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 421 – 426, 1999.

- SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal Clinical of Nutrition**, Bethesda, v.134, n.6, p.1333S-1343S, 1998.

-SAKAMOTO, L. C; HALBE, H. W. Epidemiologia da menopausa. São Paulo: Roca, p. 01 – 09, 1995.

-.SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. L.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. L.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 3º edição. Porto Alegre – Editora da UFSC, 2001. 833p.

-SOUSA, J. A.; MIRANDA, E. M. **Plantas medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis**.

http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agropecuario/index.html&conteudo=./agropecuario/artigos/plantamedia_EMBRAPA.html acesso em 18 de dezembro de 2008.

-TAPIERO, H; BA, G. N.; TEW, K. D. Estrogen and environmental estrogens. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 56, p. 36 – 44, 2002.

-TEILMANN, G.; JUUL, A.; SKAKKEBAEK, N. E.; TOPPARI, J. Putative effects of endocrine disrupters on pubertal development in the human. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 16, p. 105 –121, 2002.

-WANG, H.; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2377-2383. 1996.

-WEBSTER, W. S.; FREEMAN, J. A. D. Is this drug safe in pregnancy? **Reproductive Toxicology**, v.15, n. 06, p. 619 629, 2001.

-WEI, H. Photoprotective action of isoflavone genistein: models mechanisms, and relevance to clinical dermatology. **J Am Acad Dermatol**, v. 39, p. 271 – 272, 1998.

-WHITTEN, P. L.; LEWIS, C.; RUSSEL, E. NAFTOLIN, F. Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 208, p. 82 – 86, 1995.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)