

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

**ESTUDO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DE DUAS
FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS COMERCIAIS
CONTENDO SOJA [*Glycine max* (L.) Merr]
EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado

Clarissa Boemler Hollenbach

Porto Alegre, janeiro de 2008

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

**ESTUDO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DE DUAS
FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS COMERCIAIS
CONTENDO SOJA [*Glycine max* (L.) Merr]
EM RATOS WISTAR**

Clarissa Boemler Hollenbach

Dissertação apresentada como um dos pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Toxicologia. Orientador: Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello.

Porto Alegre, janeiro de 2008

APROVADA POR:

AGRADECIMENTOS

Ao Aroldinho, que faz a minha vida mais leve.

À minha família, Dóris, Elemar, Gabriela, Emanuel, Diva, Aroldo, Sabrina e Paulo, pela solidariedade, carinho e por perdoarem meu afastamento geográfico. É a vocês que devo minha marcha pelos caminhos do conhecimento.

Ao meu orientador prof. Dr. João Roberto Braga de Mello, pela paciência, aprendizado e apoio em todos os momentos necessários.

À Fernanda Bastos de Mello, pela gentileza e alegria de sempre.

Ao professor Milton Thiago de Mello, por todo o incentivo, não só em minha carreira, mas em minha vida.

Aos prestativos Lucas, Juliano, Juliana, Carlos Eduardo, Emanuel e Vinicius John, dos quais fui aluna, colaboradora, colega e amiga.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE GRÁFICOS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Fitoterapia no Brasil	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Aspectos botânicos de <i>Glycine Max</i> (L.) Merr	23
2.1.1. Isoflavonóides	24
2.2. Considerações históricas	26
2.3. Usos gerais	26
2.4. Fitoestrógenos	28
2.5. Usos médicos	29
2.6. Efeitos adversos sobre a reprodução	30
2.7. Testes de comportamento	33
2.8. Testes em toxicologia reprodutiva	34
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivos gerais.....	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Ensaio de toxicidade crônica e avaliação de efeitos sobre a fertilidade de machos antes e durante o acasalamento e de fêmeas antes e durante o acasalamento, gestação e lactação. ...	40
4.1.1. Formulações fitoterápicas	40
4.1.1.1. Nome comercial: Soyfemme®.....	40
4.1.1.2. Nome comercial: Isoflavine®	40
4.1.1.3. Isoflavona 43,10%	41
4.2. Preparação das formulações utilizadas	41
4.3. Animais	42
4.4. Grupos experimentais.....	42
4.5. Protocolo experimental	43
4.5.1. Tratamento	43
4.5.2. Acasalamento	43
4.5.3. Eutanásia dos machos	44
4.5.4. Cesareana	46
4.5.5. Lactação	46
4.5.6. Desenvolvimento pós-natal da prole.....	46
4.5.7. Teste de comportamento da prole	47

4.5.8.	Taxas reprodutivas calculadas	48
4.5.8.1.	Taxa de acasalamento	48
4.5.8.2.	Taxa de gestação	48
4.5.8.3.	Taxa de parto	48
4.5.8.4.	Taxa de natalidade	48
4.5.8.5.	Taxa de viabilidade	48
4.5.8.6.	Taxa de desmame	49
4.5.8.7.	Taxa de perdas pós-implantação	49
4.6.	Variáveis avaliadas	49
4.6.1.1.	Machos	49
4.6.1.2.	Fêmeas	49
4.6.1.3.	Filhotes	50
4.7.	Análise estatística	50
5.	RESULTADOS	51
5.1.	GRUPO TRATADO COM A FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA SOYFEMME	51
5.1.1.	Desenvolvimento Ponderal dos Ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento	51
5.1.2.	Consumo de água dos ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento	52
5.1.3.	Consumo de ração dos ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento	53
5.1.4.	Desenvolvimento ponderal dos ratos durante os 21 dias de acasalamento	54
5.1.5.	Consumo de ração dos ratos durante os 21 dias de acasalamento	55
5.1.6.	Consumo de água dos ratos durante os 21 dias de acasalamento	56
5.1.7.	Massa relativa de órgãos dos ratos	57
5.1.8.	Número total de espermatozóides	58
5.1.9.	Produção diária de espermatozóides	59
5.1.10.	Morfologia espermática	60
5.1.11.	Desenvolvimento ponderal das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento	61
5.1.12.	Consumo de água das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento	62
5.1.13.	Consumo de ração das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento	63
5.1.14.	Desenvolvimento ponderal das ratas durante a gestação	64
5.1.15.	Consumo de água das ratas durante a gestação	65
5.1.16.	Consumo de ração das ratas durante a gestação	66
5.1.17.	Desenvolvimento ponderal das ratas durante a lactação	67
5.1.18.	Consumo de água das ratas durante a lactação	68
5.1.19.	Consumo de ração das ratas durante a lactação	69
5.1.20.	Massa relativa de órgãos das ratas	70
5.1.21.	Índices reprodutivos dos animais tratados	71
5.1.22.	Desenvolvimento ponderal das progênies	72
5.1.23.	Características de desenvolvimento das progênies	74
5.1.24.	Registro de comportamento em campo aberto	77
5.2.	GRUPO TRATADO COM A FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA ISOFLAVINE	78
5.2.1.	Desenvolvimento ponderal dos ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento	78
5.2.2.	Consumo de água dos ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento	79
5.2.3.	Consumo de ração dos ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento	80
5.2.4.	Desenvolvimento ponderal dos ratos durante os 21 dias de acasalamento	81
5.2.5.	Consumo de ração dos ratos durante os 21 dias de acasalamento	82
5.2.6.	Consumo de água dos ratos durante os 21 dias de acasalamento	83
5.2.7.	Massa relativa de órgãos dos ratos	84
5.2.8.	Número total de espermatozóides	85

5.2.9.	Produção diária de espermatozoides	86
5.2.10.	Morfologia Espermática	87
5.2.11.	Desenvolvimento ponderal das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento.....	88
5.2.12.	Consumo de água das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento	89
5.2.13.	Consumo de ração das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento	90
5.2.14.	Desenvolvimento ponderal das ratas durante a gestação	91
5.2.15.	Consumo de água das ratas durante a gestação.....	92
5.2.16.	Consumo de ração das ratas durante a gestação.....	93
5.2.17.	Desenvolvimento ponderal das ratas durante a lactação.....	94
5.2.18.	Consumo de água das ratas durante a lactação	95
5.2.19.	Consumo de ração das ratas durante a lactação	96
5.2.20.	Massa Relativa de órgãos das Ratas	97
5.2.21.	Índices reprodutivos dos animais tratados	98
5.2.22.	Desenvolvimento ponderal das progênies.....	100
5.2.23.	Características de desenvolvimento das progênies	102
5.2.24.	Registro de comportamento em campo aberto.....	105
5.3.	Análise histopatológica	105
6.	DISCUSSÃO.....	109
6.1.	Exposição dos machos na fase de gametogênese	110
6.2.	Exposição das fêmeas no período pré-acasalamento.....	114
6.3.	Exposição das fêmeas no período de gestação e lactação	116
6.4.	Considerações finais.....	120
7.	CONCLUSÕES	122
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Massa relativa dos órgãos (%) dos machos tratados durante 91 dias com Soyfemme® (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). São apresentados os valores médios e o erro padrão médio (epm) por grupo..... 58
- Tabela 2.** Massa relativa dos órgãos (%) das fêmeas tratadas durante as fases de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). São apresentados os valores médios e o erro padrão médio (epm) por grupo..... 70
- Tabela 3.** Índices reprodutivos de ratas tratadas com o fitoterápico Soyfemme (GS). São apresentados os valores do número de observações indicados (n) e as taxas em valores percentuais. 71
- Tabela 4.** Índices reprodutivos de ratas tratadas com Soyfemme® (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-) e que pariram à termo. São apresentados os valores médios ± epm do número de observações indicados (n) e as taxas em valores percentuais..... 72
- Tabela 5.** Índices reprodutivos de ratas tratadas com Soyfemme® (GS) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ comparados a um grupo controle negativo (GC-) e que sofreram cesareana no 21º dia de gestação. São apresentados os valores médios ± epm do número de observações indicados (n). 72
- Tabela 6.** Massa relativa dos órgãos (%) dos ratos tratados durante 91 dias com fitoterápico Isoflavine (GI) em três doses 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). São apresentados os valores médios e erro padrão médio (epm). 85
- Tabela 7.** Massa relativa dos órgãos (%) das fêmeas tratadas durante as fases de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 21,5mg.kg⁻¹, um grupo controle (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). São apresentados os valores médios e o erro padrão médio (epm) por grupo..... 98
- Tabela 8.** Índices reprodutivos de ratas tratadas com extrato do fitoterápico Isoflavine (GI). São apresentados os valores do número de observações indicados (n) e as taxas em valores percentuais..... 98
- Tabela 9.** Índices reprodutivos de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+) e que pariram à termo. São apresentados os valores médios ± epm do número de observações indicados (n) e as taxas em valores percentuais. 99
- Tabela 10.** Índices reprodutivos de ratas tratadas com Isoflavine® (GI) na dose 4,3 mg.kg⁻¹ comparada a um grupo controle negativo (GC-) e que sofreram cesariana no 21º dia de gestação. São apresentados os valores médios ± epm do número de observações indicados (n). 100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Soja. Fonte: www.cisoja.com.br	23
Figura 2.	Grãos de soja. Fonte: www.cisoja.com.br	24
Figura 3.	Fórmula estrutural característica da isoflavona.	24
Figura 4.	Período de tratamento, no teste dos três segmentos (LEMÔNICA, 2001).	36
Figura 5.	Caixa de madeira onde se realiza o teste de comportamento em campo aberto.....	48
Figura 6.	Surgimento do pelo e erupção dos incisivos, no oitavo dia de vida.....	77
Figura 7.	Útero de rata (GI2) que pariu a termo oito filhotes e apresentando 13 implantes uterinos, cinco a mais do que os filhotes nascidos.	99
Figura 8.	Procedimento da cesariana, retirada dos fetos dos envoltórios fetais.	100
Figura 9.	Pesagem da ninhada, realizada diariamente.....	101
Figura 10.	Canal vaginal fechado de rata do grupo controle positivo, no 33º dia de vida.	104
Figura 11.	Testículo de animal do grupo GS2, túbulos seminíferos em diferentes estágios de epitélio, sem alterações histológicas (Objetiva 10).....	106
Figura 12.	Testículo de animal do grupo GI3, presença de espermatozóides na luz do túbulo seminífero, sem alterações histológicas (Objetiva 40).....	107
Figura 13.	Ovário com corpo lúteo de fêmea do grupo GS2 (objetiva 10).	107
Figura 14.	Fígado de fêmea do grupo GI3, sem alteração histológica (objetiva 40).....	108

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Desenvolvimento ponderal de ratos (1º dia = 100%) tratados durante a fase de pré-acasalamento com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5)..... 52
- Gráfico 2.** Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 70 dias prévios ao acasalamento, tratados com Soyfemme (GS) em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5). 53
- Gráfico 3.** Consumo percentual de ração dos machos (%) em relação à massa corporal durante os 70 dias prévios ao acasalamento, tratados com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5)..... 54
- Gráfico 4.** Desenvolvimento ponderal de ratos (1º dia = 100%) tratados com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+) durante os 21 dias de acasalamento. Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5). 55
- Gráfico 5.** Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de acasalamento, tratados com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+) durante os 21 dias do período de acasalamento. Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5)..... 56
- Gráfico 6.** Consumo percentual de água dos ratos (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de acasalamento, tratados com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5). 57
- Gráfico 7.** Número de espermatozoides presentes na cauda do epidídimo de ratos tratados durante 91 dias com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3, 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo e as barras verticais representam o erro padrão médio (epm) * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle negativo (p < 0,05). 59
- Gráfico 8.** Produção diária de espermatozoides de ratos tratados durante 91 dias com o Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo e as barras verticais representam o erro padrão médio (epm). * Valor estatisticamente diferente em relação ao grupo controle (p < 0,05). 60
- Gráfico 9.** Número de espermatozoides com alterações morfológicas nos ratos tratados durante 91 dias com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo e as barras verticais representam o erro padrão médio (epm). Os valores representam a média dos grupos e as barras verticais representam o epm. * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle negativo (p < 0,05). 61
- Gráfico 10.** Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante a fase de pré-acasalamento com o Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GS1 = 24; GS2 = 21; GS3 = 11). 62
- Gráfico 11.** Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 14 dias prévios ao acasalamento, de ratas tratadas com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GS1 = 24; GS2 = 21; GS3 = 11). 63

- Gráfico 12.** Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 14 dias prévios ao acasalamento, tratadas com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GS1 = 24; GS2 = 21; GS3 = 11). 64
- Gráfico 13.** Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante a fase de gestação com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GS1 = 13; GS2 = 5; GS3 = 2). 65
- Gráfico 14.** Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, de ratas tratadas com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GS1 = 13; GS2 = 5; GS3 = 2). 66
- Gráfico 15.** Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, tratadas com Soyfemme (GS) em três diferentes dosagens, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GS1 = 13; GS2 = 5; GS3 = 2). 67
- Gráfico 16.** Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante os 21 dias de lactação com Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 5; GC+ = 1; GS1 = 3; GS3 = 1). 68
- Gráfico 17.** Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de lactação, de ratas tratadas com Soyfemme (GS) em duas dosagens, 4,3 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 5; GC+ = 1; GS1 = 3; GS3 = 1). 69
- Gráfico 18.** Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de lactação, tratadas com Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 5; GC+ = 1; GS1 = 3; GS3 = 1). 70
- Gráfico 19.** Desenvolvimento ponderal (g) das progêneses desde o nascimento até o 36º dia, nascidos de ratas tratadas com o Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos. 73
- Gráfico 20.** Desenvolvimento ponderal (g) individual das progêneses desde o nascimento até o 36º dia, nascidos de ratas tratadas com o Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos. 74
- Gráfico 21.** Idade em dias do aparecimento das características de desenvolvimento geral das progêneses de ratas tratadas com o Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. 75
- Gráfico 22.** Idade em dias do aparecimento das características de desenvolvimento sexual das progêneses de ratas tratadas com o Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. 76
- Gráfico 23.** Freqüência de entrada no centro do campo aberto, tempo de locomoção total dentro da caixa, comportamento de “rearing” e comportamento de “escanear”. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. (GC- n = 2; GC+ n = 2; GS1 n = 2; GS3 n = 2). 78
- Gráfico 24.** Desenvolvimento ponderal de ratas do (1º dia = 100%) tratados com Isoflavine (GI) em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3). 79
- Gráfico 25.** Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 70 dias prévios ao acasalamento, tratados com Isoflavine (GI), em três diferentes doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹

- um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3)..... 80
- Gráfico 26.** Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal durante os 70 dias prévios ao acasalamento, de ratos tratados com Isoflavine (GI), em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3)..... 81
- Gráfico 27.** Desenvolvimento ponderal de ratos (1º dia = 100%) durante os 21 dias de acasalamento, tratados com Isoflavine (GI), em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3). 82
- Gráfico 28.** Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de acasalamento, tratados com Isoflavine (GI), em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3)..... 83
- Gráfico 29.** Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de acasalamento, de ratos tratados com Isoflavine (GI) em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3)..... 84
- Gráfico 30.** Número de espermatozoides presentes na cauda do epidídimo de ratos tratados durante 91 dias com Isoflavine® em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3 respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos grupos e as barras verticais representam o erro padrão médio (epm). * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle negativo.86
- Gráfico 31.** Produção diária de espermatozoides de ratos tratados durante 91 dias com o fitoterápico Isoflavine® em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3 respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos grupos e as barras verticais representam o epm. 87
- Gráfico 32.** Número de espermatozoides com alterações morfológicas nos ratos tratados durante 91 dias com Isoflavine® em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3 respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos grupos e as barras verticais representam o epm. * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle negativo. 88
- Gráfico 33.** Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante a fase de pré-acasalamento com Isoflavine® em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GI1 = 24; GI2 = 15; GI3 = 8). 89
- Gráfico 34.** Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 14 dias prévios ao acasalamento, de ratas tratadas com Isoflavine em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GI1 = 24; GI2 = 15; GI3 = 8)..... 90
- Gráfico 35.** Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 14 dias prévios ao acasalamento, tratadas com Isoflavine (GI) em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GI1 = 24; GI2 = 15; GI3 = 8). 91
- Gráfico 36.** Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante a fase de gestação com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GI1 = 13; GI2 = 2)..... 92
- Gráfico 37.** Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GI1 = 13; GI2 = 2)..... 93
- Gráfico 38.** Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ um grupo

	controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GI1 = 13; GI2 = 2).....	94
Gráfico 39.	Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante os 21 dias de lactação com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg ⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo (GC- = 5; GC+ = 1; GI1 = 2 ; GI2 = 1).....	95
Gráfico 40.	Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg ⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 5; GC+ = 1; GI1 = 2; GI2 = 1).	96
Gráfico 41.	Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de lactação, tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg ⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 5; GC+ = 1; GI1 = 2; GI2 = 1).	97
Gráfico 42.	Desenvolvimento ponderal (g) das progênes desde o nascimento até o 36º dia, nascidos de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg ⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos.	101
Gráfico 43.	Desenvolvimento ponderal (g) individual das progênes desde o nascimento até o 36º dia, nascidos de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg ⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos.	102
Gráfico 44.	Idade em dias do aparecimento das características de desenvolvimento geral das progênes de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg ⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.	103
Gráfico 45.	Idade em dias do aparecimento das características de desenvolvimento sexual das progênes de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg ⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.	104
Gráfico 46.	Frequência de entrada no centro do campo aberto, tempo de locomoção total dentro da caixa, comportamento de “rearing” e comportamento de “escanear”. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. (GC- n = 2; GC+ n = 2; GI1 n = 2; GI2 n = 2).....	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise da variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

epm – erro padrão da média

EPA – Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental)

FDA – Food and Drug Administration (Departamento de Alimentos e Remédios)

GC- – grupo controle negativo

GC+ – grupo controle positivo

GI – grupo Isoflavine

GS – grupo Soyfemme

LTDA – limitada

Merr – Merrill

MR – medidas repetidas

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development (Organização para
Cooperação Econômica e Desenvolvimento)

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Resolução

S/A – Sociedade Anônima

RESUMO

No presente trabalho avaliou-se os efeitos de duas formulações fitoterápicas comerciais contendo soja [*Glycine max* (L.) Merr], Soyfemme® da Ache Laboratórios Farmacêuticos S.A e Isoflavine® da Herbarium Laboratório Botânico Ltda. sobre a fertilidade e o desenvolvimento ponderal de ratos Wistar, bem como o desenvolvimento ponderal das progênies. As dosagens foram obtidas através da recomendação dos fabricantes sendo a dose terapêutica recomendada $4,3 \text{ mg.kg}^{-1}$. Constituíram-se oito grupos experimentais, um grupo controle negativo (GC-) que recebeu água destilada, um grupo controle positivo (GC+) que recebeu isoflavonas semelhantes às da soja na dose de 4mg.kg^{-1} , três grupos tratados com o fitoterápico Soyfemme® e três grupos tratados com Isoflavine® em três doses $4,3\text{mg.kg}^{-1}$, $21,5\text{mg.kg}^{-1}$ e 43mg.kg^{-1} , respectivamente, GS1, GS2, GS3 e GI1, GI2, GI3. Os animais foram tratados diariamente por via oral, em fases determinadas. Os machos foram tratados durante 91 dias, sendo 70 dias antes do acasalamento e o restante durante o acasalamento. As fêmeas foram tratadas antes e durante o acasalamento, gestação e lactação. Metade das fêmeas prenhes sofreu cesariana no 21º dia de gestação, o restante das fêmeas pariu a termo e as suas proles foram avaliadas até a manifestação das características sexuais nos machos (descida dos testículos à bolsa escrotal e separação prepucial) e nas fêmeas (abertura do canal vaginal) e até a realização do teste de comportamento em campo aberto, aos 75 dias de idade. Os resultados mostram que as formulações fitoterápicas não interferiram no desenvolvimento ponderal dos machos tratados nem das suas progênies, mas interferiram no desenvolvimento ponderal das fêmeas antes do acasalamento. As formulações fitoterápicas interferiram no número total de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo e na morfologia espermática nos grupos tratados de forma dose dependente. O número de espermatozoides $\times 10^6$ armazenados na cauda do epidídimo ($x \pm \text{epm}$) foi de (GC- = $1978,8 \pm 184,4$; GC+ = $1322 \pm 142,6$; GS1 = $1735 \pm 90,3$; GS2 = $1448,3 \pm 222,3$; GS3 = $1174 \pm 219,8$; GI1 = $2071,6 \pm 156,5$; GI2 = $1864 \pm 203,2$; $1121,7 \pm 175,9$). O percentual de alterações morfológicas nos espermatozoides foi de (GC- = 6%; GC+ = 8,8%; GS1 = 13,3%; GS2 = 19,7%; GS3 = 22,6% e GI1 = 12,3%; GI2 = 28,8% e GI3 = 27,7%). As taxas de

acasalamento apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo nas três doses do fitoterápico Isoflavine® (GC- = 69,2%; GC+ = 45,5%; GI1 = 22,2%; GI2 = 22%; GI3 = 37,5%) enquanto que os grupos tratados com o fitoterápico Soyfemme®, apenas a dose maior (GC- = 69,2%; GS3 = 30%). As taxas de gestação apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo no grupo controle positivo e a dose maior do fitoterápico Isoflavine® (GC- = 81,3; GC+ = 20%; GI3 = 0%). As taxas de perdas pós-implantação apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo em diferentes doses testadas dos dois fitoterápicos (GC- = 0%; GS3 = 21%; GI1 = 11,1%; GI2 = 8%). As taxas de parto foram diferentes estatisticamente do grupo controle negativo nos dois fitoterápicos (GC- = 100%; GS2 = 50%; GI2 = 50%). As taxas de desmame e viabilidade foram diferentes em relação ao grupo controle negativo apenas os grupos do fitoterápico Soyfemme® (GC- = 100%; GS2 = 0%; GS3 = 61,5). Na taxa de viabilidade GS2 diferiu de GC- (GC- = 100%; GS2 = 60%). Nas taxas de natalidade, apenas a maior dose do fitoterápico Isoflavine® apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (GC- = 100%; GI2 = 55,5%). As fêmeas tratadas como fitoterápico Soyfemme® que sofreram cesarianas foram diferentes estatisticamente do grupo controle negativo no número de filhotes e no peso do útero gravídico. Com relação às progênies, não houve alterações nos grupos, no que se refere ao desenvolvimento ponderal individual, na massa corporal total da ninhada e no teste de comportamento em campo aberto.

ABSTRACT

In these work the effects of two commercials phytoterapics formulations containing [Glycine max (L.) Merr] soy Soyfemme® of Ache Laboratórios Farmacêuticos S.A and Isoflavine® of Herbarium Laboratório Botânico Ltda were evaluated on fertility, development weight of Wistar rats and of their offspring. Doses was obtained through the manufacturer recommendation be the therapeutical dose 4,3 mg.kg⁻¹. The animals were divided in eight experimental groups, one negative control group (GC-), that received distilled water, one positive control group (GC+), that received similar soy isoflavones and three groups were treated with phytoterapic formulation Soyfemme® and three groups were treated with phytoterapic formulation Isoflavine® in three doses, 4,3mg.kg⁻¹, 21,5m.kg⁻¹ and 43mg.kg⁻¹, respectively, GS1, GS2, GS3 and GII, GI2, GI3. The animals were treated daily orally, in determined phases. The males were treated during ninety days, seventy days before the mating and twenty one during the mating. The females were treated before and during the mating, pregnancy and lactation. Half of the pregnant females were submitted to a cesarean section on the 21st day of pregnancy. The rest of the female were allowed to give birth, and their pups were evaluated until the manifestation of the sexual characteristics and until open field habituation task. The results showed that phytoterapics formulations have not interfered in the weight development of the male treated and neither their offspring but, have interfered weight development before mating females. Both phytoterapics formulations have interfered in the total number of spermatozoa stored in the caudal epididymis and the sperm morphology, in dose dependency. The number of stored spermatozoa in the caudal epididymis ($x \pm epm$) was GC- = 1978,8 ± 184,4; GC+ = 1322 ± 142,6; GS1 = 1735 ± 90,3; GS2 = 1448,3 ± 222,3; GS3 = 1174 ± 219,8; GII = 2071,6 ± 156,5; GI2 = 1864 ± 203,2; 1121,7 ± 175,9. The percentage of morphologic modifications in the sperms was: GC- = 6%; GC+ = 8,8%; GS1 = 13,3; GS2 = 19,7; GS3 = 22,6 e GII = 12,3%; GI2 = 28,8% e GI3 = 27,7%. The index the of mating have presented statistic difference among the groups in three doses the Isoflavine® related to the negative control group ($p < 0,01$) (GC- = 69,2%; GC+ = 45,5%; GII = 22,2%; GI2 = 22%; GI3 = 37,5%) while the groups treated with

Soyfemme® only the higher dose (GC- = 69,2%; GS3 = 30%). The index of pregnancy have presented statistic difference among the groups related to the negative control group in the positive control group and the Isoflavine® higher dose ($p < 0,01$) (GC- = 81,3; GC+ = 20%; GI3 = 0%). The index of pos-implantation loss presented statistic difference among the groups related to the negative control group in different doses in both phytoterapics (GC- = 0%; GS3 = 21%; GI1 = 11,1%; GI2 = 8%). The delivery index were different statistically to the negative control group in both phytoterapics (GC- = 100%; GS2 = 50%; GI2 = 50%). The index of the weanling and viability was different statistically related to the negative control only Soyfemme® (GC- = 100%; GS2 = 0%; GS3 = 61,5%). The viability index (GC- = 100%; GS2 = 60%). In the birth index only the higher dose presented statistic difference related to the negative control group Isoflavine® phytoterapic (GC- = 100%; GI2 = 55,5%). Females treated with Soyfemme® in the higher doses submitted to a cesarean section were different statistically to the negative control group in the pup numbers and the uterine gravidic weight. Concerning the pups there wasn't any modification among the groups in terms of individual weight development, in the weight young's and the open field habituation task.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a medicina progride em todos os sentidos, mas o interesse pela fitoterapia e pela homeopatia como opções terapêuticas vem crescendo dia a dia. Calcula-se que o Brasil disponha de algo entre 60 a 250 mil espécies vegetais onde 40% delas devem conter propriedades terapêuticas (OLIVEIRA & AKISSUE, 1989). Como propósito de aperfeiçoar este arsenal medicamentoso, o homem tem se valido da ciência que lhe possibilitou conhecer inúmeras substâncias e processos elaborados pela natureza e criar diversos outros compostos químicos de uso medicinal (CASTRO & CHEMALE, 1995).

A grande procura por alternativas naturais, para prevenir e curar enfermidades aumentou o consumo de plantas medicinais sob a forma de chás ou outras preparações da planta e formas farmacêuticas. Com isso, alguns princípios ativos pouco estudados se tornam um perigo real para a saúde da população. Para tanto, os estudos da toxicidade pré-clínica, além da avaliação da segurança e eficácia dos fitoterápicos se tornam de extrema importância.

A legislação brasileira sobre medicamentos é de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde e, em sua resolução RDC nº 48, e resoluções RE nº 88, 89, 90 e 91 de 16 de março de 2004, normatiza o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. A legislação estabelece que a segurança de uso e as indicações terapêuticas deverão ser validadas através de uma de três opções: 1. Atingir pontuação (mínimo 6 pontos) com estudos publicados em obras da “lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos” publicada periodicamente em função da experiência acumulada pela área de registro de fitoterápicos da ANVISA com apoio de consultores externos; 2. Apresentar comprovação de segurança de uso (toxicologia pré-clínica, toxicologia clínica) e eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica, farmacologia clínica) do medicamento. Para os ensaios de toxicologia pré-clínica as resoluções preconizam a utilização do “Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” e; 3. Apresentar levantamento bibliográfico (etno-farmacológico e de utilização, documentação técnico-científica e publicações) que é avaliado com critérios

de indicação de uso (episódica ou para curtos espaços de tempo), coerência com relação às indicações terapêuticas propostas, ausência de risco tóxico ao usuário, ausência de grupos ou substâncias químicas tóxicas, ou presentes dentro de limites comprovadamente seguros e, comprovação de uso por um período igual ou superior a 20 anos.

A legislação estabelece ainda a existência de uma “Lista de registro simplificado de fitoterápicos” na qual estão presentes fitoterápicos que não necessitam validar as indicações terapêuticas e a segurança de uso, desde que as especificações ali citadas sejam integralmente respeitadas. As especificações são; parte usada, padronização, forma de uso, indicações/ações terapêuticas, dose, via de administração, posologia e restrição ao uso.

As isoflavonas são compostos químicos fenólicos e estão amplamente distribuídos no reino vegetal. As concentrações destes compostos são relativamente maiores nas leguminosas e, em particular, na soja (*Glycine max* (L.) Merr), possuindo diversas propriedades biológicas (atividade antioxidante, inibição da atividade enzimática e outras) que podem influenciar muitos processos bioquímicos e fisiológicos. As isoflavonas possuem estrutura química semelhante a dos estrógenos, tais como o 17 β -estradiol (SETCHELL, 1998).

Duas das preparações fitoterápicas contendo soja [*Glycine max* (L.) Merr.], Soyfemme® da Ache Laboratórios Farmacêuticos S.A e Isoflavine® da Herbarium Laboratório Botânico Ltda. obtiveram registro junto à ANVISA antes das publicações das resoluções. Embora constem na categoria de “fitoterápicos simples”, não foram incluídos na “Lista de registro simplificado de fitoterápicos”. A validade do registro de ambos os fitoterápicos se encerra respectivamente em 04/2008 e 11/2007. Independente da forma pela qual a solicitação de renovação de registro for encaminhada, os fabricantes alertam que os dois fitoterápicos não devem ser usados durante a gestação e lactação. A justificativa apoiada por ampla revisão de literatura é de que “não há estudos disponíveis suficientes sobre a teratogenicidade de preparações com alta concentração de isoflavonas, bem como não há evidências científicas disponíveis sobre a segurança de seu emprego durante a gestação e lactação, devendo seu uso ser evitado nessas situações”.

Baseado na necessidade explícita de dados sobre a toxicidade reprodutiva de preparações fitoterápicas que contenham isoflavonas da soja, o presente estudo pretende

avaliar os efeitos das duas preparações fitoterápicas, usando os modelos internacionalmente recomendados para avaliação de toxicidade reprodutiva em ratos Wistar.

Os estudos recomendados pela FDA, OECD e ANVISA, divididos em segmentos I, II e III devem ser usados para avaliar: I. Toxicidade crônica, II. Teratogenicidade e; III. Toxicidade peri e pós-natal. O Segmento I é usado para avaliar toxicidade crônica, com avaliação dos efeitos na fertilidade de machos e fêmeas, formação e maturação espermáticas, acasalamento e fertilização, com machos tratados antes e durante o acasalamento e fêmeas antes e durante a gestação e lactação.

1.1. Fitoterapia no Brasil

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e envolve um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional. As áreas de conhecimento envolvidas vão desde a antropologia botânica, botânica, agronomia, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia, química orgânica até a tecnologia farmacêutica.

Estes produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, contudo a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (MIGUEL & MIGUEL, 1999).

A legislação em vigor, ainda incipiente, visa regulamentar e oficializar o desenvolvimento e o uso de fitoterápicos, de modo a contrapor a expressão que comumente se ouve tanto dos usuários quanto dos profissionais da saúde que, no momento da prescrição e dispensação, referem “o que é natural não possui efeitos colaterais”. Tal afirmação é enganosa e remete a inúmeros riscos à saúde da população. Diversos autores têm demonstrado que as plantas medicinais possuem efeitos indesejáveis e muitas vezes tóxicos e consideram-se ainda as Resoluções da Anvisa, que regulamentam a coleta, o estudo farmacológico e toxicológico de drogas, incluindo a

Resolução que regulamenta o registro dos fitoterápicos (Anvisa, 2004). Também a polêmica lei de patentes, onde as comunidades nativas possuem seu conhecimento explorado e discutido, mas não possuem direito ao lucro obtido dele. A menos que providenciem o registro em cartório da planta e do seu uso pela própria comunidade, para que esta, mesmo que indiretamente, possa ser beneficiada pelos resultados obtidos a partir da exploração de seu conhecimento (Anvisa, 1996).

Infelizmente, o estado de arte da maioria dos fitoterápicos fabricados atualmente pela indústria brasileira está fundamentado somente no uso popular das plantas sem nenhuma comprovação pré-clínica nem clínica, não podendo, portanto ser competitivo a nível nacional e muito menos internacional. Esta situação poderá levar ao desaparecimento das indústrias nacionais de fitoterápicos. Diante desta perspectiva, indaga-se permanentemente quais seriam os fatores responsáveis por esta grave situação. Evidentemente são vários e de diferentes níveis de responsabilidade. (PEDROSA et al, 2001).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos botânicos de *Glycine Max* (L.) Merr.

A soja cultivada comercialmente hoje (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta herbácea, incluída na classe Dicotyledoneae, ordem Fabales, família Leguminosae, subfamília das Papilionoideae, gênero *Glycine* L. (Figura 1) (SOUZA & LORENZI, 2005).

É uma planta com grande variabilidade genética, tanto no ciclo vegetativo, período compreendido da emergência da plântula até a abertura das primeiras flores, como no reprodutivo, período do início da floração até o fim do ciclo da cultura, sendo também influenciada pelo meio ambiente (CISOJA, 2007). Os grãos da soja são as partes da planta mais utilizadas, possuindo múltiplos proveitos (Figura 2).

Há grande diversidade de ciclo. De modo geral, os cultivares brasileiros têm ciclos entre 100 e 160 dias, e podem ser classificados em grupos de maturação precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio, dependendo da região (CISOJA, 2007).



Figura 1. Soja. Fonte: www.cisoja.com.br.

No Brasil, a soja tem ampla distribuição geográfica, a produção em larga escala de soja iniciou pelo Rio Grande do Sul, expandindo-se para Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e região centro-oeste, sendo hoje cultivada em

praticamente todo o país. A produção mundial de soja em 2005 foi de 190 milhões de toneladas (WIKIPÉDIA, 2006).



Figura 2. Grãos de soja. Fonte: www.cisoja.com.br

2.1.1. Isoflavonóides

Os flavonóides são metabólitos secundários de vegetais e constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância no reino vegetal. Os isoflavonóides são uma classe de flavonóides de distribuição taxonômica restrita, em Gymnospermae foi relatada somente em 2 gêneros (*Podocarpus e Juniperus*) e em Angiospermae somente na família Fabaceae. São caracterizados por uma cadeia arila-C3-arila, do tipo difenil-1,2-propano. Esta classe de flavonóides apresenta uma diversidade estrutural importante: além de isoflavonas (Figura 3), isoflavononas, isoflavenos e aril-3cumarinas encontram-se estruturas ciclizadas como pterocarpanos, cumestanos, cumaronocromas, sendo que algumas possuem um carbono suplementar (rotenóides) (ZUANAZZI, 1999).

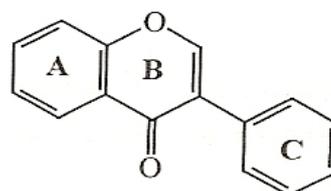


Figura 3. Fórmula estrutural característica da isoflavona.

As três propriedades biológicas mais importantes dos isoflavonóides são: atividade estrogênica das isoflavonas e cumestanos, antifúngicas e antibacterianas (fitoalexinas) dos isoflavonóides e as propriedades inseticidas dos rotenóides (ZUANAZZI, 1999).

Os isoflavonóides têm sido associados a diversos benefícios à saúde, tais como: prevenção de doenças cardiovasculares, combate ao colesterol, prevenção de câncer e osteoporose, e alívio dos sintomas da menopausa, entre outros (EMBRAPA, 2006).

As isoflavonas ocorrem naturalmente nos grãos de soja e na maioria dos produtos de soja ocidentais, como β -glicosídeos conjugados, β -glicosidases e enzimas intestinais. São isolados três tipos principais de isoflavonas da soja, a genisteína, a daidzeína e a gliciteína. A daidzeína e a genisteína e seus derivados glicosilados podem atingir 3g/Kg nos grãos da soja. Os três tipos de isoflavonas estão presentes em quatro formas isoméricas: agliconas, glicosídeos, acetilglicosídeos e malonilglicosídeos (WANG & MURPHY, 1994).

Os teores de isoflavonas nas suas diferentes formas variam de acordo com condições climáticas e do cultivar analisado. Segundo Carrão-Panizzi et al. (1999) a concentração de isoflavonas em soja é geneticamente determinada e afetada pelos fatores ambientais, como a temperatura local. Park et al. (2001) analisaram os teores de isoflavonas em cultivares de soja e o efeito da temperatura na extração das isoflavonas. O aquecimento a 121 °C durante 40 minutos promoveu uma redução de até 17,6 vezes no teor das malonil-isoflavonas e um aumento de aproximadamente 2,5 vezes na concentração de glicosil-isoflavonas.

Glicosil-isoflavonas, como genistina e daidzina possuem menos atividade biológica, que suas formas agliconas, genisteína e daidzeína, e são as principais formas encontradas no grão de soja (PARK, et al., 2001).

Além das isoflavonas, há outras substâncias presentes nos grãos da soja, dentre esses compostos estão as fibras, os oligossacarídeos, os inibidores de proteases e as saponinas (EMBRAPA, 2006).

2.2. Considerações históricas

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.), espécie de grande valor econômico, teve como centro de origem o continente asiático, mais precisamente a região correspondente à China Antiga. Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, vindo atrás apenas dos Estados Unidos. Outros grandes produtores são a Argentina, a China e a Índia (WIKIPÉDIA, 2006).

As evidências históricas dão conta de que a soja foi “domesticada” no século XI A.C., na região do Vale do Rio Amarelo no norte da China, sendo provavelmente este seu local de origem. As referências mais antigas sobre a soja na literatura parecem estar contidas no livro intitulado “Pen Ts’ao Kang Mu” ou “Matéria Médica” escrito pelo imperador Shen Nung, no ano de 2838. A.C. Há registros de várias tentativas posteriores no sentido da “domesticação”, que parece ter sido obtida efetivamente no século XI A.C., durante a dinastia Shang (EMBRAPA, 2006).

No ocidente, onde permaneceu como curiosidade botânica por quatro séculos, a soja chegou entre o final do século XV e início do XVI, em decorrência das navegações européias para a Ásia (EMBRAPA, 2006).

No Brasil, os registros revelam que a soja foi introduzida na Bahia em 1882, em São Paulo em 1908 por imigrantes japoneses e em 1914 no Rio Grande do Sul, pela então Escola de Agronomia e Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi nesse Estado cultivada em larga escala, expandindo-se para Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e região centro-oeste, sendo hoje cultivada em praticamente todo o país. O País produz hoje aproximadamente 30% do total de soja produzida no mundo (EMBRAPA, 2006).

2.3. Usos gerais

As sementes da soja fornecem uma das mais importantes fontes de óleo e proteína. Os grãos maduros são consumidos como vegetais e os grãos secos são ingeridos íntegros, triturados ou na forma de broto. Após processamento, os grãos dão origem ao leite de soja, um suplemento protéico usado na nutrição infantil, podendo também fornecer queijo e soro. O molho obtido da fermentação do feijão de soja madura é usado como base para outros molhos. Os grãos torrados são usados como

substitutivos do café. Os grãos processados originam um óleo semi-seco comestível, usado na produção de óleos para saladas, margarina e manteiga vegetal. O óleo é utilizado industrialmente na produção de tintas, sabão, inseticidas e desinfetantes. As lecitinas obtidas como subprodutos da indústria do óleo são usadas como agentes umidificantes e estabilizantes na indústria de alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos, couro, tinta, plástico, sabão e detergentes. A farinha de soja é uma rica fonte protéica para alimentação animal. Proteínas extraídas da farinha e dos grãos de soja são usadas na produção de fibras sintéticas, adesivos, colas, fibra têxtil entre outros. A farinha de soja é usada em padarias e outros produtos alimentícios, bem como na condição de aditivo a produtos cárneos e elementos nutricionais (nutracêuticos). As porções vegetativas da planta são usadas para confecção de silagem, feno ou forragem (DUKE, 1981).

Transformada em matéria-prima para combustível, a soja virou alvo de especulação, os preços do grão decolaram com a divulgação dos estoques americanos de milho, agora aplicado no etanol, e com a quebra de mais da metade da safra de trigo na Austrália. O mercado ficou especulativo e o fato de a soja ter se transformado numa alternativa de produção de energia limpa e renovável criou um novo mote para a agricultura mundial (FOLHAONLINE, 2006).

A soja é uma planta apropriada para a recuperação de solos fracos e por isso, no Brasil, está sendo muito usada para a recuperação de Cerrados (CRIAR E PLANTAR, 2007). Substituir porções de Cerrado com mata nativa por soja ou pasto pode causar aumentos de temperatura de até 4°C e uma redução de até 24% nas chuvas durante a estação seca na porção leste do território amazônico (INPE, 2007).

Preocupados com essas questões e com avanço indiscriminado da soja no entorno das terras indígenas, um pequeno grupo de pessoas e organizações tem começado a se reunir para discutir alternativas e estratégias para enfrentar esses problemas. A ocupação predatória do bioma, nas últimas décadas, tem deflagrado um rápido processo de perda da biodiversidade, erosão do solo e escasseamento e contaminação dos recursos hídricos. Restam apenas 25% do cerrado coberto por vegetação natural e a perda dessa cobertura afeta diretamente as bacias hidrográficas que nascem e correm no bioma. As cabeceiras estão secando, prejudicando a população e a produção, e os rios estão poluídos e assoreados. Mais de 3% do que resta do cerrado são derrubados a cada ano. Com o *boom* da soja, a expansão da fronteira agropecuária

acelerou-se. Em 15 anos, se não mudar a tendência, não sobrarão mais do que alguns fragmentos do Cerrado (MARANDU, 2007).

A soja, que desperta a ira dos ambientalistas pela esmagadora expansão de suas variedades transgênicas, soma uma nova acusação: pressionar as florestas amazônicas brasileiras. Embora os cultivos dessa oleaginosa não substituam diretamente áreas de mata da Amazônia, sua expansão em zonas próximas eleva o preço da terra e “empurra” outras atividades menos rentáveis que avançam sobre a mata, como a pecuária. Além disso, o cultivo da soja, atualmente o principal produto de exportação brasileiro, progride acompanhado pela criação de infra-estrutura para transporte, que é um grande vetor de desmatamento (TIERRAMÉRICA, 2007).

2.4. Fitoestrógenos

As isoflavonas presentes na soja pertencem à família dos polifenóis, uma grande classe de substâncias sintetizadas pelas plantas. Além da atividade antioxidante, comum aos polifenóis, as isoflavonas por sua semelhança estrutural ao estrógeno humano, determinam efeitos estrogênicos importantes, sendo por isso referidos como fitoestrógenos (WANG & MURPHY, 1994).

Os estrogênios são responsáveis pelas características femininas, controle reprodutivo e gestação, influenciam a pele, os ossos, sistema cardiovascular e imunidade. Os estrogênios endógenos, como o estradiol, têm em geral meia-vida curta, não se acumulam nos tecidos, são facilmente metabolizados no fígado e são mais potentes que qualquer estrogênio sintético, exceção feita ao dietilestibestrol (TAPIERO et al., 2002).

As isoflavonas presentes na soja são hidrolisadas no intestino por β -glicosidades, liberando as agliconas que são farmacologicamente ativas. Elas podem ser absorvidas ou fermentadas pela microflora intestinal, dando origem a metabólitos específicos. A biodisponibilidade é influenciada pela capacidade da microflora intestinal em converter as isoflavonas em suas formas ativas. A genisteína é biotransformada em p-etilfenos e a daidzeína em equol ou O-demetilangolesina. Predominantemente absorvida no jejuno, a forma aglicônica das isoflavonas é transportada ao fígado, onde realiza ciclo êntero-hepático. Parte das isoflavonas alcança a circulação sistêmica sendo

distribuída pelo organismo. A eliminação é predominantemente renal, de forma semelhante aos estrógenos endógenos (WANG & MURPHY, 1996).

A propriedade estrogênica e antiestrogênica dos fitoestrógenos depende da concentração dos mesmos, da concentração dos esteróides sexuais endógenos e do órgão alvo específico envolvido na interação com os receptores de estrogênios (RE). Esse efeito pode ser explicado pela existência de dois tipos de RE: α e β . Os α - receptores (RE- α) são os principais receptores encontrados na mama e no útero, e os β - receptores (RE- β) no osso e no sistema cardiovascular. O estradiol tem afinidade por ambos receptores, enquanto as isoflavonas são mais seletivas para os RE- β , na proporção de 1/20 para o α e 1/3 para o β (NACHTIGALL, 2001).

Na pré-menopausa, quando a concentração hormonal é elevada os RE estão ocupados e as isoflavonas competem pelos sítios receptores. Como apresentam menor atividade biológica que os estrógenos endógenos, o resultado é uma fraca ação antiestrogênica das isoflavonas. A esta ação é atribuída a diminuição do risco de câncer hormônio dependente. Na pós-menopausa, quando a concentração do estrógeno endógeno diminui em média 60%, os receptores ficam mais disponíveis, favorecendo a fraca ação estrogênica das isoflavonas, acabando por compensar a deficiência do hormônio (SETCHELL & CASSIDY, 1999).

2.5. Usos médicos

Há farta literatura referente aos usos da soja e de suas isoflavonas para a prevenção e tratamento de doenças. Além da substituição do leite animal em crianças com manifestações alérgicas, as principais indicações terapêuticas são: tratamento de sintomas pré e pós-menopausa na prevenção da osteoporose, na prevenção e tratamento de câncer, na prevenção de doenças cardiovasculares e como auxiliar no tratamento do diabetes.

Com relação aos usos peri-menopausa, estudos multicêntricos são contraditórios. Brzezinski et al. (1997) concluíram através de um estudo com 145 mulheres pós-menopausa, recebendo dieta rica em fitoestrógenos durante 12 semanas, que houve redução dos sintomas de menopausa em 50%, dos fogachos em 54% e da secura vaginal em 60%. Albertazzi et al. (1999) e Upmalis et al. (2000), realizando estudos multicêntricos, duplo-cegos, randomizados e conta-placebo, concluíram que os

fitoestrógenos aliviaram sintomas vasomotores, diminuíram a incidência e severidade das ondas de calor. Secreto et al. (2004), realizando estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado concluíram, por sua vez, que os resultados não mostraram qualquer vantagem de isoflavonas e melatonina sobre o placebo no alívio dos sintomas da menopausa. A revisão sistemática realizada por Huntley & Ernst (2004), com relação ao uso de soja no tratamento de sintomas de menopausa mostrou que de 13 estudos multicêntricos, dez se incluíam dentro de critérios aceitáveis. Dos dez, quatro estudos sugeriram que as preparações de soja foram benéficas no tratamento de sintomas perimenopausa, seis mostraram resultados negativos. Baseado no levantamento desses estudos, Huntley & Ernst (2004) concluíram que há alguma evidência de eficácia de preparações de soja para o tratamento dos sintomas da menopausa, mas que devido à heterogeneidade de resultados é difícil o estabelecimento de um postulado definitivo.

Os estudos referentes aos efeitos protetores sobre o câncer também são contraditórios havendo relatos de benefícios na utilização “*in vitro*” e “*in vivo*” (DUNCAN et al., 2000) e relatos inconclusivos e maléficos (LEMOS, 2001; JU et al.; THIGPEN et al. 2001).

Com relação aos usos da prevenção de doenças cardiovasculares, dietas com baixos teores de ácidos graxos saturados e colesterol, ricas em isoflavonas e antioxidantes tem sido recomendadas. Anderson et al. (1995) realizaram um estudo de meta-análise sobre os efeitos das proteínas da soja sobre os lipídeos séricos, chegando a conclusão de que elas, diferente da proteína de origem animal, reduzem a concentração de colesterol total, do LDL e de triglicérides. Teede et al. (2001), concluem que a soja apresenta efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, mas alertam para os potenciais efeitos adversos, especialmente em homens e mulheres pós-menopausa.

2.6. Efeitos adversos sobre a reprodução

As isoflavonas são substâncias presentes principalmente na soja e em seus derivados, denominadas de fitoestrógenos por apresentarem semelhança estrutural com os hormônios estrogênicos, no entanto, o impacto clínico do uso das isoflavonas ainda revela resultados conflitantes (FERNANDES et al. 2006).

Também é farta a literatura sobre os potenciais efeitos adversos decorrentes da ingestão de soja e suas isoflavonas. São relatados: interferência no sistema

imunológico, alterações na função tireoideana, redução da absorção de vitaminas e minerais, efeito sobre o processo de mielinização, desencadeamento de câncer, produção de danos no DNA, entre outros. (JU et al., 2001; ALLRED et al., 2001; MARKOVITS et al., 1989).

Os efeitos adversos mais amplamente documentados são os que indicam as ações sobre a reprodução. Nesse aspecto, a soja e suas isoflavonas são classificadas com compostos com atividade endócrina e por isso são referidas como desreguladores endócrinos (WISNIEWSKI et al., 2003).

Os fitoestrógenos funcionam como agonistas ou antagonistas estrogênicos. São hormônios agonistas/antagonistas naturais que ocupam destaque no grupo de desreguladores endócrinos. Até o momento, os estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” não mostraram resultados consistentes e uniformes sobre se os fitoestrógenos poderiam mimetizar as ações estrogênicas em todos os órgãos-alvo (CLAPAUCH, 2002).

Conforme Delclos et al. (2001), animais machos também podem ser sensíveis aos efeitos das isoflavonas, já que a genisteína pode inibir o crescimento e proliferação de células testiculares e, em ratos, mostraram que a genisteína pode desregular a espermatogênese e diminuir o número de espermatozóides presentes no epidídimo.

Foi descrita maior incidência de hipospádia (risco relativo= 4,99; intervalo de confiança = 2,10-11,88) em 7.928 meninos cujas mães seguiram uma dieta vegetariana rica em fitoestrógenos durante a gravidez (NORTH et al., 2000). A exposição neonatal a dois fitoestrógenos, genisteína e zearelenona, alteram a resposta pós-puberal do hipotálamo ao hormônio liberador das gonadotrofinas em ratos. A segurança das fórmulas baseadas em soja está sendo investigada devido a potencial ação hormonal dos fitoestrógenos em períodos críticos do desenvolvimento (CLAPAUCH, 2002).

Os estudos conduzidos por Nagao et al. (2001), realizando a exposição neonatal de ratos e ratas Sprague Dawley a concentrações crescentes de genisteína, principal isoflavona da soja, mostram que apesar de não causarem alteração na separação prepucial e na abertura vaginal, na contagem de espermatozóides nem na concentração sérica de testosterona, foram observadas alterações histopatológicas ovarianas, uterinas e testiculares e redução da fertilidade das fêmeas expostas. Os

autores concluíram que a exposição à genisteína causa disfunção do desempenho reprodutivo pós-puberdade, bem como no desenvolvimento gonadal de fêmeas.

A exposição a concentrações de genisteína durante a gestação e lactação de ratos Long Evans resultou no aparecimento de anomalias urogenitais na puberdade, redução da distância ano-genital, redução testicular e retardamento da separação prepucial. O comportamento sexual foi modificado, sendo os machos expostos menos hábeis na monta, introdução e ejaculação. Os machos expostos apresentaram redução na concentração de testosterona na idade adulta. Os autores concluíram que os efeitos observados são um alerta para a saúde humana, tendo em vista as relações entre desreguladores endócrinos e a crescente incidência de anormalidades urogenitais em meninos e homens (WISNIEWSKI et al., 2003). Investigando os efeitos da presença de concentrações de genisteína na alimentação de ratas Sprague Dawley a partir do sétimo dia de gestação até o final da amamentação e os filhotes até os 50 dias de vida, Delclos et al. (2001) mostraram que mesmo índices de exposição humana são capazes de produzir redução do peso de ninhadas, redução do peso da próstata, hiperplasia de ductos alveolares de glândulas mamárias de machos e fêmeas, maturação anormal de células vaginais, espermatogênese retardada com presença de espermatozoides aberrantes, déficit de espermatozoides no epidídimo, entre outros efeitos. Concluíram que a consequência da exposição à genisteína produz efeitos múltiplos em tecidos sensíveis aos estrógenos tanto em machos quanto em fêmeas.

Os estudos de Jung et al. (2004) mostraram que camundongos nascidos de mães alimentadas com ração à base de soja e então tratados com genisteína não apresentaram alterações testiculares, epididimais e prostáticas, sugerindo que a concentração de genisteína utilizada durante a fase juvenil não afeta o desenvolvimento reprodutivo de camundongos.

Takahashi et al. (2003) investigaram os efeitos da exposição de ratos Sprague Dawley à fibra de soja solúvel por três meses. Concluíram que a maior dose sem efeito adverso observado (NOAEL – *no observed adverse effect level*) situa-se em 40.000 ppm, equivalente a 2,43 g/kg para machos e 2,91 g/kg para fêmeas.

Para identificar os efeitos das isoflavonas na fertilidade de machos, Faqi et al. (2004) avaliaram os parâmetros reprodutivos de ratos Wistar que foram expostos a uma mistura chamada PTIG-535, caracterizada por conter proporções de isoflavonas semelhantes às da soja (45% de genisteína, 23% de daidzeína e 4% de gliceteína). Os

ratos receberam concentrações das isoflavonas de 200 a 2000 mg/kg de alimento, durante 12 meses. A exposição não induziu toxicidade ou mudanças no ganho de peso. Não foram observadas mudança de peso dos testículos e epidídimos e os achados histopatológicos não diferiram do grupo controle. Contagem de espermátidas, produção de espermatozóides e morfologia espermática não sofreram alterações. Concluem que o sistema reprodutivo de ratos adultos é relativamente insensível aos níveis de fitoestrógenos da soja preconizados para prevenção do câncer em humanos.

2.7. Testes de comportamento

A ansiedade é descrita como um estado emocional que tem componentes psicológicos e fisiológicos, que fazem parte do espectro normal das experiências humanas e animais, sendo propulsora do desempenho. Ela passa a ser patológica quando é desproporcional à situação que a desencadeia, ou quando não existe um objeto específico ao qual se direcione (ANDRADE & GORENSTEIN, 1998).

Em um ambiente novo, potencialmente perigoso, os animais apresentam comportamentos de avaliação do risco potencial e, uma vez definido um perigo real, comportamentos de fuga ou luta contra o agressor (BLANCHARD & BLANCHARD, 1990), sendo que essas respostas comportamentais são geralmente acompanhadas e intensas alterações neurovegetativas e hormonais (GRAEFF, 1989).

A atividade exploratória de animais de laboratório pode ser analisada pelo modelo do campo aberto (*open-field*), que permite observar como o animal se comporta em amplo ambiente medindo o seu estado emocional (HO et al., 2002).

Neste experimento são avaliados; a movimentação espontânea entre as divisões, no centro e na periferia do campo, indicando atividades exploratórias, a imobilidade representando o medo e o número de “*rearings*” atividade em que o animal procura levantar-se. Este movimento é relacionado com o objetivo de exploração e fuga do ambiente (VIANNA, 2000).

2.8. Testes em toxicologia reprodutiva

A toxicidade reprodutiva refere-se à interferência tóxica ao sistema reprodutor a qualquer espécie de capacidade reprodutiva tanto de machos, quanto de fêmeas, incluindo o desenvolvimento pré-natal (NEUBERT & CHAHOUD, 1995).

Testes de toxicidade reprodutiva são realizados para determinar os efeitos diretos de uma substância química sobre o processo de reprodução dos mamíferos. Devido à complexidade dos processos que envolvem a fertilidade e desenvolvimento é inevitável que distúrbios fisiológicos advindos da exposição a agentes químicos possam em muitos casos exercer um efeito deletério indireto sobre esses processos (LEMÔNICA, 2001).

As características do conceito e sua capacidade de desenvolvimento e maturação são expressões da capacidade de fertilização de células germinativas, concepção bem sucedida e o subsequente desenvolvimento intra-uterino. O desenvolvimento peri e pós-natal depende do potencial de desenvolvimento do indivíduo e de sua habilidade de enfrentar variadas circunstâncias ambientais (MELLO & LANGELOH, 2006).

Diversos fatores, como tempo, espaço, custo e, principalmente, fatores éticos limitam estudos toxicológicos sobre a reprodução humana e animal, tornando imprescindível o uso de modelos animais para avaliação de possíveis efeitos da exposição a determinados agentes químicos sobre a função reprodutiva (HAYES, 1994).

Levando-se em conta que os objetivos da avaliação da toxicidade reprodutiva e da teratogenicidade são os de evidenciar possíveis riscos de xenobióticos para a espécie humana e para animais domésticos, os testes são realizados, em sua maioria, em mamíferos. Ratos, camundongos e coelhos reúnem diversas características que os torna animais de escolha para sustentar os testes em laboratório, como: período curto de gestação, prole numerosa, útero com dois cornos nos quais os sítios de implantação têm distribuição regular, placenta tipo hemocorial, como no ser humano (MELLO & LANGELOH, 2006).

O Manual para Avaliação de Risco em Toxicidade Reprodutiva, organizado pela Environmental Protection Agency (EPA) apresenta dados para avaliar o potencial tóxico de agentes ambientais sobre sistemas reprodutivos masculinos e femininos e o

desenvolvimento de descendentes. Este manual foca a função do sistema reprodutivo, como comportamento sexual, fertilidade, conseqüências da gestação e habilidade de lactação e todos os processos que podem afetar essas funções diretamente. Estão incluídos os efeitos sobre a gametogênese e a maturação dos gametas, os órgãos reprodutivos e os componentes do sistema endócrino que sustentam diretamente essas funções (EPA, 1996a).

A fertilidade dos homens é particularmente suscetível a agentes que reduzem o número e a qualidade da produção de espermatozóides. Comparada com muitas outras espécies, homens produzem menos espermatozóides relativo ao número de espermatozóides requeridos para fertilidade (AMANN, 1981; WORKING, 1988). Como resultado, muitos homens são inférteis ou subférteis (AMANN, 1981). A infertilidade em homens é considerada quando a concentração de espermatozóides está abaixo de 20×10^6 por ml de ejaculado. Com a concentração de espermatozóides descendo abaixo desse nível, a probabilidade de uma gravidez resultante de uma ejaculação diminui. Se o número de espermatozóides normais por ejaculado é suficientemente baixa, a fertilização é improvável e existe uma condição infértil (EPA, 1996a).

A passagem de toxicantes do pai para a mãe pode ocorrer através da transferência seminal nos animais e no homem, havendo pequenas evidências de que essa transferência seja responsável por perdas pré-implantação. O tratamento dos machos antes da concepção pode resultar em infertilidade, morte embrionária, anomalias não específicas, bem como redução do peso ao nascer, diminuição do tamanho da ninhada e retardo do desenvolvimento pós-natal (COLIE, 1993; DELCLOS et al., 2001).

Os testes de avaliação da toxicidade reprodutiva e teratogenicidade geralmente compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento e, continuamente até sua maturação sexual. (LEMÔNICA, 2001). Os estudos mais utilizados para estas avaliações são divididos em três segmentos que são adaptados de normas da Environmental Protection Agency (EPA) e recomendadas pela Food and Drugs Administration (FDA) e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), são eles:

- a) Segmento I – toxicidade crônica, avalia os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas tratados antes e durante o acasalamento e de fêmeas durante a prenhez e lactação;
- b) Segmento II – toxicidade pré-natal, avalia as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie expostas durante a fase de organogênese;
- c) Segmento III – toxicidade peri e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

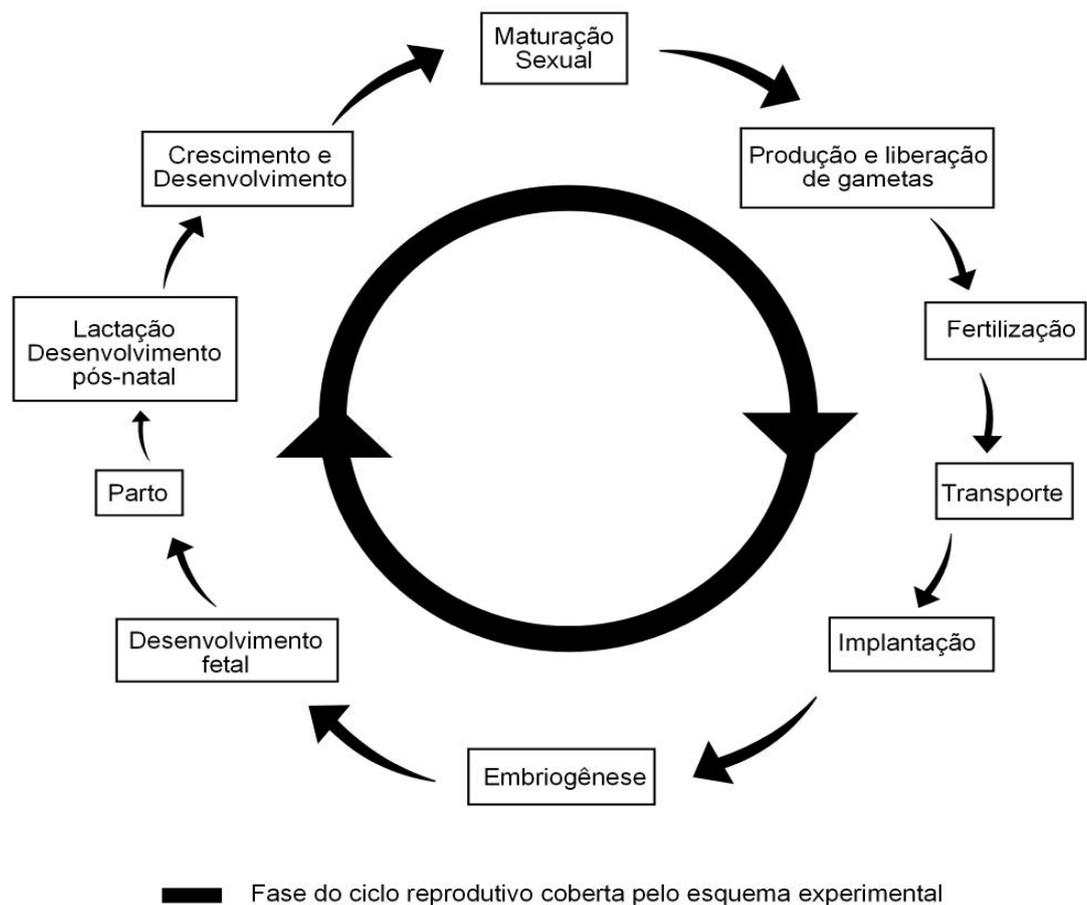


Figura 4. Período de tratamento, no teste dos três segmentos (LEMÔNICA, 2001).

Através desses estudos é possível avaliar o efeito da substância química no organismo animal nas diferentes fases de desenvolvimento, desde o período neonatal, até a idade adulta e reprodutiva (Figura 4).

Quanto aos ratos, convencionalmente utiliza-se a espécie *Rattus norvegicus* e freqüentemente a linhagem Wistar. Os machos atingem a maturidade sexual entre 60 e 75 dias de vida. Sua fertilidade máxima encontra-se entre 100 e 300 dias e a senescência reprodutiva se dá ao redor dos 360 dias de idade. Nas fêmeas a maturidade sexual é atingida entre 60 e 75 dias de vida, fertilidade máxima entre 90 e 120 dias e a senescência reprodutiva se dá aos 360 dias de idade. O ciclo estral é regular, de natureza poliéstrica anual, com ciclos de 4 a 5 dias. O estro dura de 10 a 20 horas, com ovulação espontânea. O período de gestação tem duração de 20 a 22 dias, e o tamanho da prole varia entre 5 e 15 filhotes (COBEA, 1996).

A via de administração mais utilizada nos testes de toxicidade reprodutiva é a oral, através de intubação gástrica, por permitir dosagem precisa da substância teste e padronização dos níveis plasmáticos maternos. Diferentes vias, como a via dérmica, inalatória ou outras podem ser utilizadas quando as condições de exposição ou as características físico-químicas da substância teste assim exigirem (LEMÔNICA, 2001).

A natureza das substâncias a serem testadas é outro fator de importância, de forma geral, a redução do tamanho da partícula aumenta a solubilidade, aumentando a absorção e a toxicidade de forma direta. As substâncias devem ser diluídas em um veículo (geralmente aquoso) (ANDERSON & CONINNG, 1993).

Para avaliar adequadamente os potenciais efeitos de um agente sobre os sistemas reprodutivos, um período prolongado de tratamento é necessário. Por exemplo, os danos causados a espermatogônias serão encontrados nas amostras da cauda do epidídimo ou em ejaculados por 8 a 14 semanas, dependendo da espécie testada. Com alguns agentes químicos que causam bioacumulação, o impacto total sobre um determinado tipo de célula poderia ser ainda mais atrasado, o que poderia causar impacto sobre parâmetros funcionais, como a fertilidade. Em tais situações, a adequação da duração da dosagem é um fator crítico na avaliação do risco (EPA, 1996).

Com relação às substâncias puras, as doses utilizadas nos testes toxicológicos devem respeitar uma escala logarítmica (ANDERSON & CONINNG, 1993), e devem ser realizadas três doses em três concentrações diferentes: a maior dose que causa o menor efeito tóxico (NOAEL dose “*no observed effect level*”), a menor dose que abaixo da dose tóxica manifesta atividade farmacológica para a espécie em estudo (LOAEL dose “*lowest observed effect level*”) e outra dose intermediária (EPA, 1996).

Muitos estudos de toxicidade de substâncias puras ou plantas, utilizam doses capazes de provocar “toxicidade sistêmica”, na qual a manifestação mais comum é a redução de massa corporal e perda de peso. No estudo de toxicidade crônica, isso é considerado inadequado, pois pode mascarar a toxicidade reprodutiva. Os animais que manifestam algum sinal de toxicidade devem ter uma diferença de peso de 10 a 12% em relação ao controle. Se essa diferença torna-se maior, as variáveis de interesse específico podem ser influenciadas (CHAPIN et al., 1993).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Contribuir com conhecimentos sobre os potenciais riscos da utilização de fitoterápicos à base de soja, especialmente no que se refere à toxicidade reprodutiva.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos de duas formulações fitoterápicas contendo *Glycine max* (L.) Merr. (soja), Soyfemme da Ache Laboratórios Farmacêuticos S/A e Isoflavine da Herbarium Laboratório Botânico Ltda. sobre a fertilidade de ratos Wistar machos e fêmeas, formação e maturação espermática, acasalamento e fertilização, gestação e lactação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Ensaio de toxicidade crônica e avaliação de efeitos sobre a fertilidade de machos antes e durante o acasalamento e de fêmeas antes e durante o acasalamento, gestação e lactação.

4.1.1. Formulações fitoterápicas

Os fitoterápicos utilizados nos experimentos bem como o princípio ativo dos fitoterápicos, a isoflavona utilizada no controle positivo foram adquiridos em estabelecimento farmacêutico local, com os mesmos números de lotes, contendo data de fabricação e ambos estando dentro do prazo de validade.

4.1.1.1. Nome comercial: Soyfemme®

Fabricante: Ache Laboratórios Farmacêuticos S/A

Composição declarada na bula:

Extrato seco de *Glycine Max* (L.) Merr. 40%.....150mg

Excipientes: celulose microcristalina, dióxido de sílico coloidal, silicato de magnésio e estearato de magnésio.

Concentração de marcador: 60mg de isoflavona por cápsula.

Parte utilizada da planta: grãos

Forma farmacêutica: cápsula gelatinosa veículo = extrato seco

Registro na Anvisa: 105730280

Lote: 0602436

4.1.1.2. Nome comercial: Isoflavine®

Fabricante: Herbarium Laboratório Botânico Ltda.

Composição declarada na bula:

Extrato de *Glycine Max* (L.) Merr. 40%.....75mg

Excipiente: Óleo de soja.....q.s.p. 250mg

Concentração de marcador: 30mg de isoflavona por cápsula.

Parte utilizada da planta: grãos

Forma farmacêutica: cápsula gelatinosa, veículo = óleo

Registro na Anvisa: 118600028

Lote: SI060326

4.1.1.3. Isoflavona 43,10%

Importador: DEG importadora de Produtos Químicos LTDA

Origem: China

Composição declarada:

Descrição: Pó fino, marrom claro, odor característico

Doseamento: mínimo 40,0% de isoflavonas em base seca

Daidzina8,93%

Glicitina..... 3,84%

Genistina.....3,89%

Daidzeína..... 25,75%

Gliciteína..... 0,53%

Genisteína.....0,16%

Lote: 3253A5

Data de Fabricação: 03/2006

Data de Validade: 03/2009

4.2. Preparação das formulações utilizadas

As formulações fitoterápicas foram obtidas através da diluição do conteúdo das cápsulas dos medicamentos, utilizando como veículo água destilada. As dosagens foram obtidas através da recomendação dos fabricantes sendo a dose terapêutica recomendada duas cápsulas de Soyfemme® e duas cápsulas de Isoflavine®, para um adulto de 70 kg ($4,3 \text{ mg.kg}^{-1}$). A dose de Isoflavine® foi ajustada para se igualar à dose de Soyfemme®. As dosagens subseqüentes foram calculadas para cinco e 10 vezes a dose recomendada pelo fabricante.

A concentração de 4,3mg foi diluída em 10ml de água destilada, chegando ao volume final de duas cápsulas de Soyfemme e quatro cápsulas de Isoflavine em 700ml de água destilada, garantindo uma concentração definida dos ingredientes das cápsulas em um pequeno volume a ser administrado, dose de 1ml para 100g de animal (rato).

Logo após a diluição das cápsulas, a formulação foi homogeneizada em ultra-som, armazenada em frasco âmbar e mantido sob refrigeração. As formulações

foram feitas no início dos tratamentos de cada dosagem e no caso de sobra, o material era desprezado no final de cada fase do experimento. Minutos antes da administração aos animais, as formulações eram retiradas da geladeira, colocadas em copos de Becker e homogeneizadas novamente.

A formulação usada no grupo controle positivo foi obtida através da diluição do pó de isoflavonas em água destilada, na dose de $4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para cada 10ml, de modo que cada animal receba 1ml/100g de massa corporal.

4.3. Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar, 48 machos com idade inicial de 120 dias e 124 fêmeas com idade inicial de 90 dias (machos com massa corporal de $333,6 \pm 8,7\text{g}$ e fêmeas com massa corporal de $219 \pm 6,1\text{g}$), provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL) Os animais foram mantidos no CREAL, sendo previamente adaptados, por 14 dias, às condições constantes de umidade, temperatura ($21^\circ\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro escuro de 12 horas (das 9h às 21h). Foram alimentados com ração comercial Nuvital CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Alojamento, manejo, tratamento e eutanásia dos animais obedeceram às normas publicadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, obedecendo às leis brasileiras, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS.

4.4. Grupos experimentais

Foram constituídos oito grupos experimentais:

- **Grupo I.** GS1- Soyfemme tratado com a dose recomendada pelo fabricante para uso diário em seres humanos ($4,3\text{mg}/\text{kg}$), $n = 8$ machos e 24 fêmeas.
- **Grupo II.** GS2- Soyfemme tratado com uma dose equivalente a cinco vezes a dose terapêutica recomendada pelo fabricante ($21,5\text{mg}/\text{kg}$). $N = 6$ machos e 18 fêmeas.
- **Grupo III.** GS3- Soyfemme tratado com dose equivalente a 10 vezes a dose terapêutica recomendada pelo fabricante ($43\text{mg}/\text{kg}$ -). $N = 5$ machos e 15 fêmeas.

- **Grupo IV.** GI1- Isoflavine tratado com a dose recomendada pelo fabricante para uso diário em seres humanos (4,3mg/kg - GI1). N = 8 machos e 24 fêmeas.
- **Grupo V.** GI2 Isoflavine tratado com uma dose equivalente a cinco vezes a dose terapêutica recomendada pelo fabricante (21,5mg/kg). N = 5 machos e 15 fêmeas.
- **Grupo VI.** GI3- Isoflavine tratado com a dose equivalente a 10 vezes a dose terapêutica recomendada pelo fabricante (43mg/kg). N = 3 machos e 9 fêmeas.
- **Grupo VII.** GC- Controle negativo tratado com água destilada (veículo) destituída de fitoestrógenos. N = 8 machos e 24 fêmeas.
- **Grupo VIII.** GC+ Controle positivo tratado com isoflavona, na dose de 4mg/kg. N = 5 machos e 15 fêmeas.

4.5. Protocolo experimental

4.5.1. Tratamento

Os machos foram tratados por 70 dias antes do acasalamento e durante os 21 dias de acasalamento. Durante o período de experimentação, foram mantidos em caixas de polipropileno medindo (40 x 33 x 16,5cm) com maravalha.

As fêmeas foram tratadas por 14 dias antes do acasalamento, durante o período de acasalamento (21 dias), gestação (21 dias) e até o final da lactação (21 dias). As fêmeas foram mantidas em caixas de polipropileno individuais medindo (29,5 x 18,5 x 11cm) com maravalha, durante o período de experimentação.

Todos os animais foram tratados diariamente, por via oral, através de sonda oro-gástrica flexível com volume idêntico em todos os grupos, correspondendo a 10ml/kg.

4.5.2. Acasalamento

O período de acasalamento teve duração de 21 dias, correspondendo a três ciclos de cinco dias consecutivos, com intervalo de 48 horas entre o início de cada um dos ciclos.

Na caixa de cada um dos machos foram introduzidas três fêmeas virgens, permanecendo com eles duas horas por dia (das 7h às 9h), correspondendo ao final do período escuro.

Após esse período, os animais foram separados e a constatação de gestação foi realizada mediante a presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, realizado diariamente e analisado ao microscópio óptico com aumento de dez vezes.

Vinte e quatro horas após a constatação de esfregaço vaginal positivo, era considerado o primeiro dia de gestação.

4.5.3. Eutanásia dos machos

Os machos foram eutanasiados por decapitação, após pré-anestesia com cloridrato de xilazina na dose de 1mg/kg, 48 horas após o último dia de acasalamento.

A pele e a parede abdominal foram incisadas e os órgãos sexuais foram removidos: testículos, epidídimo, ductos deferentes, vesícula seminal e próstata. Também foram retirados os rins, fígado, baço e coração de cada um dos animais.

Cada órgão foi dissecado e pesado em balança analítica individualmente, exceto os ductos deferentes. A vesícula seminal foi esvaziada antes da sua pesagem.

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

O macerado resultante de cada testículo e cada epidídimo foi acondicionado em *ependorffs* individuais, sendo retirado um volume correspondente a 100µl de cada macerado. Cada *ependorff* foi acrescido de 900µl de solução de NaCl 0,9%, chegando a um volume final de 1 mililitro.

Desse volume foi realizada a contagem do número total de espermatozóides (cauda do epidídimo) e o número de espermátidas por animal (testículo), sendo utilizada para tanto uma câmara de Neubauer, na qual foram contados 128 pequenos quadrados. A contagem foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40 vezes. O número

de espermatozóides e sua produção diária foram determinados através das seguintes fórmulas:

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

$$S = C \times FC \times V / 6,1 \text{ (Produção diária de espermatozóides)}$$

$$S = \text{Soma total por animal}$$

$$C = \text{Número de espermatozóides ou espermátidas contados}$$

$$FC = \text{Fator câmara (1,250)}$$

$$V = \text{Diluição (10}^6\text{)}$$

6,1 = Número de dias em que as espermátidas em estágios IV – VIII são resistentes.

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

Para análise histológica, um testículo por grupo foi fixado em solução de *Bouin* imediatamente depois de removido. Os órgãos coletados de todos os animais foram fixados com solução de formalina tamponada, e como os testículos, foram examinados no laboratório de Patologia Clínica Veterinária, do Departamento de Medicina Animal, da Faculdade de Veterinária da UFGRS.

Os órgãos enviados ao laboratório de Patologia foram desidratados, passando por uma série gradativa de soluções alcoólicas até 100% e acrescidos de parafina derretida até seu resfriamento e endurecimento. A parafina endurecida foi aparada em forma de bloco e cortada em fatias pelo micrótomo. Esses cortes foram lavados com xilol para remover a parafina e corados com hematoxilina e eosina, segundo técnica de Ross et al. (1989).

4.5.4. Cesareana

No 21º dia de gestação, metade das fêmeas gestantes de cada grupo após serem pré-anestesiadas com cloridrato de xilazina, na dose 1mg/kg, foram sacrificadas por decapitação. O útero gravídico foi retirado e pesado, com seu conteúdo.

O útero foi incisado longitudinalmente com tesoura, em toda sua extensão. Os fetos foram separados de seus envoltórios fetais, observados quanto à sua vitalidade e à presença de mal-formações macroscópicas externas.

O cordão umbilical de cada feto foi incisado e os fetos foram removidos do útero materno, secos em papel toalha, marcados com caneta marcadora na região dorsal do corpo, respeitando a ordem que estavam no útero, iniciando pelo corno uterino direito e finalizando no corno uterino esquerdo, e pesados individualmente.

Após a retirada dos fetos, o útero foi inspecionado e foram contados os implantes uterinos.

4.5.5. Lactação

A outra metade das fêmeas de cada grupo foi acompanhada deste o parto até o 21º dia de lactação. Neste dia, as fêmeas foram pré-anestesiadas com cloridrato de xilazina, na dose 1mg/kg e posteriormente sacrificadas por decapitação, sendo removidos e inspecionados o fígado, baço, rins, ovários, útero e coração. Cada órgão foi pesado individualmente em balança analítica. No útero foram contados os implantes uterinos presentes. Todos os órgãos foram fixados em solução de formol tamponado e enviados para análise histopatológica.

4.5.6. Desenvolvimento pós-natal da prole

A prole das fêmeas paridas foi observada desde o dia do nascimento (dia zero). Os animais foram sexados e marcados individualmente com tinta nanquim por via subcutânea nos coxins plantares no dia do nascimento. O número de filhotes vivos e mortos foi registrado. As ninhadas foram pesadas diariamente até o 35º dia pós-natal e os filhotes individualmente nos dias 0, 7, 14, e 21. Cada filhote foi avaliado quanto ao desenvolvimento físico geral, no qual foi observado o dia do aparecimento da penugem (primeira detecção de penugem), descolamento dos pavilhões auriculares (quando ambos estavam descolados), erupção dos dentes incisivos (quando os dois incisivos já

havia sofrido erupção) desenvolvimento do pêlo, abertura dos olhos (quando ambos estavam completamente abertos) e desenvolvimento sexual, onde foi observado o dia da descida dos testículos, separação prepucial e abertura do canal vaginal.

Após o desmame (21º dia de lactação), os animais foram colocados em caixas coletivas até o final do acompanhamento do desenvolvimento físico geral e sexual.

4.5.7. Teste de comportamento da prole

A prole de cada grupo teve seu comportamento testado através do teste de campo aberto. O teste consistiu na mensuração das variáveis comportamentais dos filhotes aos 75 dias de idade, colocados individualmente em uma caixa de madeira de 1m² (Figura 5) com paredes de 50cm de altura, com sua base dividida em quadrantes de 20cm² perfazendo um total de 25 quadrados, sendo 16 laterais (próximos às paredes) e nove centrais. Cada animal foi colocado, individualmente, em um dos cantos, virados para a parede da caixa e registrou-se seu comportamento em vídeo durante 5 minutos. Após cada registro o aparato experimental era totalmente limpo com álcool 70%.

O teste foi realizado durante o ciclo claro e foram analisadas as categorias comportamentais: atividade exploratória (caracterizada pela locomoção total e permanência no centro), “escanear” e “rearing” (permanecer sobre duas patas traseiras investigando o ambiente, no centro do campo aberto ou nas laterais, respectivamente), auto-limpeza (número de vezes que o animal utiliza as patas dianteiras para limpeza) (LUCION et al.1996; AZEVEDO, 2005).

As análises comportamentais deste trabalho foram registradas no programa Noldus ethovision® e submetidas à análise estatística para verificação de possíveis diferenças entre os grupos.

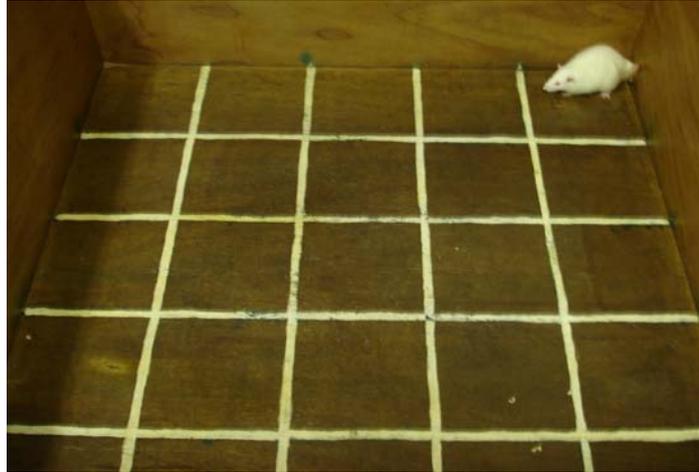


Figura 5. Caixa de madeira onde se realiza o teste de comportamento em campo aberto.

4.5.8. Taxas reprodutivas calculadas

4.5.8.1. Taxa de acasalamento

Representada pela divisão entre o número de fêmeas com esfregaço vaginal positivo (presença de espermatozóides) e o número de fêmeas acasaladas multiplicado por cem.

4.5.8.2. Taxa de gestação

Representada pela divisão (quociente) entre o número de fêmeas prenhes e o número de fêmeas com esfregaço vaginal positivo (presença de espermatozóides) multiplicado por cem.

4.5.8.3. Taxa de parto

Representada pela divisão (quociente) entre o número de fêmeas paridas a termo e o número de fêmeas gestantes multiplicado por cem.

4.5.8.4. Taxa de natalidade

Representada pela divisão (quociente) entre o número total de filhotes nascidos vivos e o número total dos filhotes nascidos (vivos e/ou mortos) multiplicado por cem.

4.5.8.5. Taxa de viabilidade

Representada pela divisão (quociente) entre o número de filhotes que permaneceram vivos até o quarto dia de lactação e o total de filhotes nascidos vivos vezes cem.

4.5.8.6. Taxa de desmame

Representada pela divisão (quociente) entre o número total dos filhotes até o 21º dia de lactação e o número total de filhotes nascidos vivos vezes cem.

4.5.8.7. Taxa de perdas pós-implantação

Representada pela divisão (quociente) entre o número resultante da subtração do número de sítios de implantação e o número de fetos nascidos, e o número total de sítios de implantação contados vezes cem.

4.6. Variáveis avaliadas

4.6.1.1. Machos

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

4.6.1.2. Fêmeas

- Massa corporal diária (g) durante o pré-acasalamento e gestação;
- Consumo diário de ração (g) pré-acasalamento;
- Consumo diário de água (ml) pré-acasalamento;
- Sinais de toxicidade sistêmica como: perda de peso progressiva e redução na ingestão de água e ração;
- Percentual de mortalidade durante o experimento;

- Análise das taxas reprodutivas.

4.6.1.3. Filhotes

- Peso individual no dia do nascimento e a cada sete dias;
- Peso da ninhada no dia nascimento e a cada sete dias;
- Proporção de sexo;
- Número de filhotes nascidos vivos e mortos;
- Desenvolvimento físico geral;
- Desenvolvimento físico sexual;
- Teste de comportamento da prole;

4.7. Análise estatística

A metodologia utilizada na análise estatística incluiu os testes: análise de variância (ANOVA) teste de Bonferroni e o Qui-quadrado. As variáveis quantitativas referentes à influência das diferentes doses de preparações fitoterápicas sobre o desenvolvimento ponderal dos animais de cada grupo, consumo de água e de ração, massa corporal relativa dos órgãos de machos, número de espermatozoides e produção diária, variáveis reprodutivas referente aos machos e fêmeas, foram comparadas através da análise de variância (ANOVA fator único e ANOVA de Medidas Repetidas). As variáveis qualitativas referentes às taxas reprodutivas calculadas, ao percentual de alterações morfológicas nos espermatozoides foram calculadas através do teste do Qui-quadrado, (SPSS 11 para Windows) todas respeitando os valores estatisticamente significativos, com uma confiança de 95% (α 0,05). O programa utilizado para efetuar essa análise foi o Excel 2003 para Windows. A análise estatística do teste de comportamento foi realizada no programa Noldus Information Technology. Todos os grupos tratados, bem como o grupo controle positivo foram comparados estatisticamente com o grupo controle negativo. Com relação as variáveis quantitativas, quando foi necessário a comparação entre médias, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni (SAMPAIO, 1998).

5. RESULTADOS

5.1. GRUPO TRATADO COM A FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA SOYFEMME

5.1.1. Desenvolvimento Ponderal dos Ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento

O Gráfico 1 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 70 dias de tratamento prévios ao acasalamento, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) dos ratos tratados diariamente por via oral com o fitoterápico Soyfemme® (GS), em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, GS1, GS2 e GS3, respectivamente, um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+).

Verifica-se que todos os grupos apresentaram ganho relativo de massa corporal durante o período pré-acasalamento, no entanto, apresentaram diferença estatisticamente significativa [ANOVA de MR = 0,012] conforme o teste de Bonferroni, o grupo GS3 foi estatisticamente diferente do grupo controle negativo nos primeiros 30 dias de tratamento. Observou-se um ganho relativo de 4,1% entre o 1º e o 70º dia de tratamento.

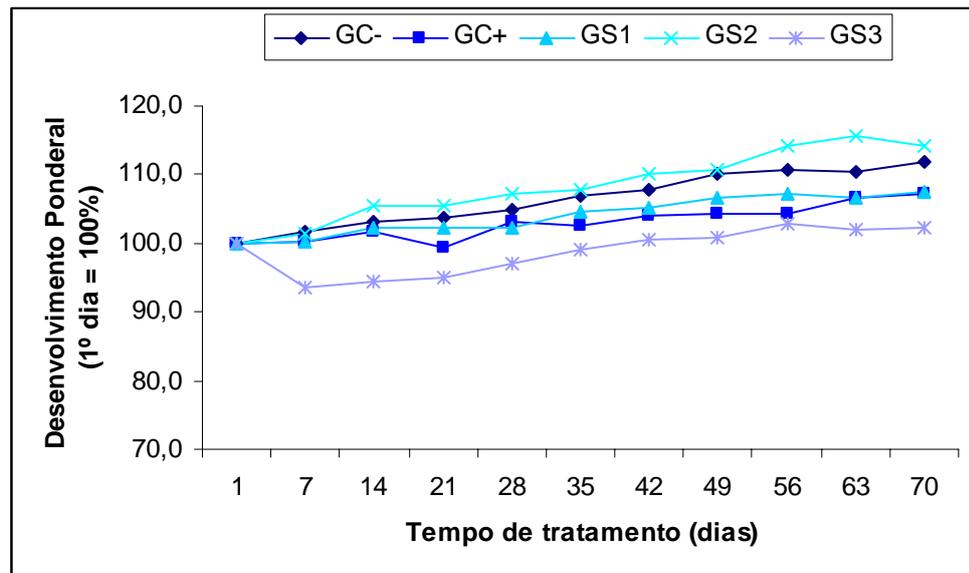


Gráfico 1. Desenvolvimento ponderal de ratos (1º dia = 100%) tratados durante a fase de pré-acasalamento com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5).

5.1.2. Consumo de água dos ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento

O **Gráfico 2** mostra o consumo de água em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 70 dias de tratamento prévios ao acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g), ratos tratados por via oral com Soyfemme® (GS), com três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC) e um grupo controle positivo (GC+). Observou-se que tanto os animais dos grupos controles positivo e negativo, quanto os tratados com o fitoterápico, apresentaram um consumo relativo de água (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR p = 0,211].

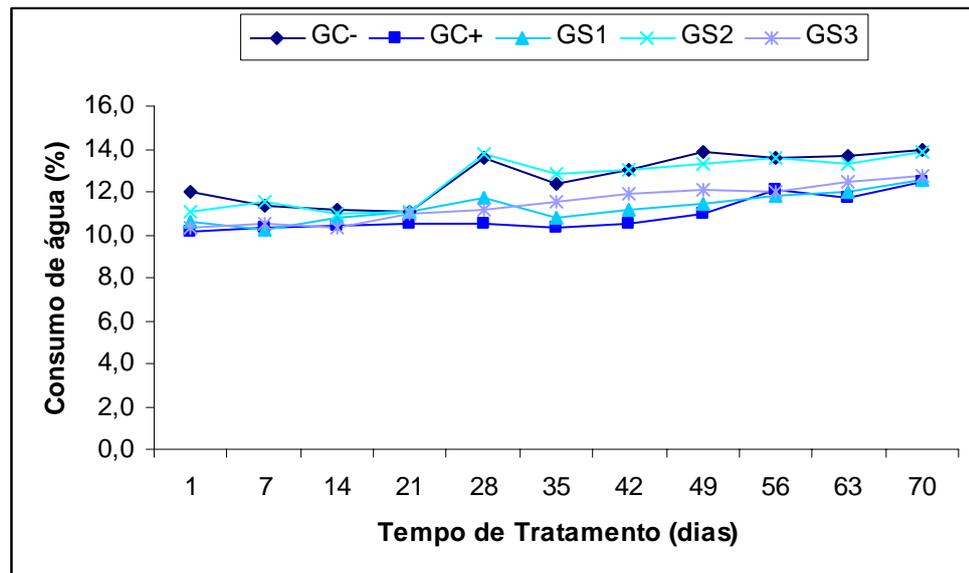


Gráfico 2. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 70 dias prévios ao acasalamento, tratados com Soyfemme (GS) em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5).

5.1.3. Consumo de ração dos ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento

O **Gráfico 3** mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 70 dias de tratamento prévios ao acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g), de ratos tratados por via oral com Soyfemme® (GS) em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verificou-se que tanto os ratos tratados com o fitoterápico quanto os ratos dos grupos controles positivo e negativo apresentaram um consumo relativo de ração (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos [ANOVA de MR: p = 0,431].

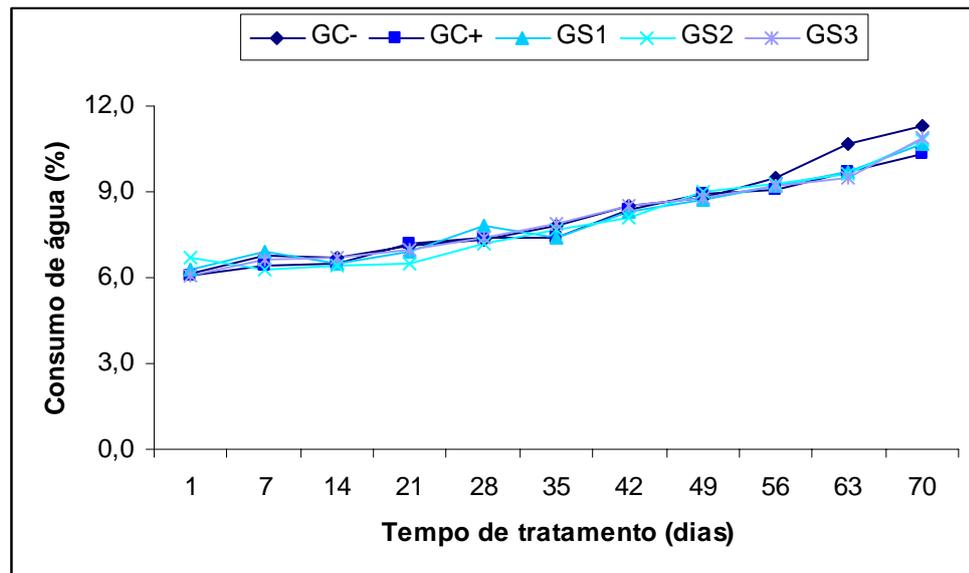


Gráfico 3. Consumo percentual de ração dos machos (%) em relação à massa corporal durante os 70 dias prévios ao acasalamento, tratados com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5).

5.1.4. Desenvolvimento ponderal dos ratos durante os 21 dias de acasalamento

O Gráfico 4 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 21 dias de tratamento durante o período de acasalamento, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) dos ratos tratados por via oral com o fitoterápico Soyfemme® (GS) em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos. [Análise da variância: p = 0,134].

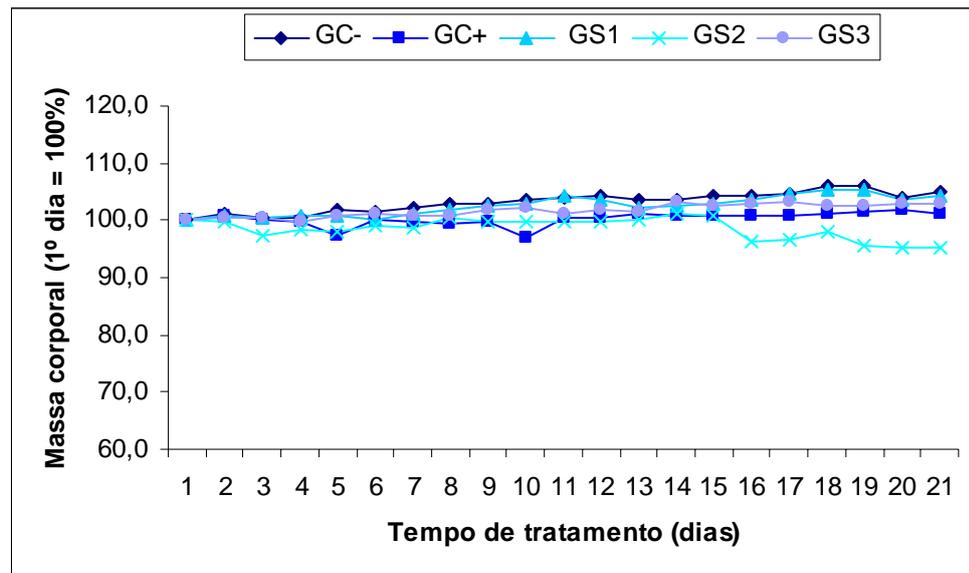


Gráfico 4. Desenvolvimento ponderal de ratos (1º dia = 100%) tratados com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+) durante os 21 dias de acasalamento. Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5).

5.1.5. Consumo de ração dos ratos durante os 21 dias de acasalamento

O Gráfico 5 mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de tratamento durante o período de acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g), de ratos tratados por via oral com Soyfemme® (GS) em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que tanto os ratos tratados com o fitoterápico quanto os ratos dos grupos controles negativo e positivo, apresentaram um consumo relativo de ração (%) semelhante. Apesar das flutuações, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,094].

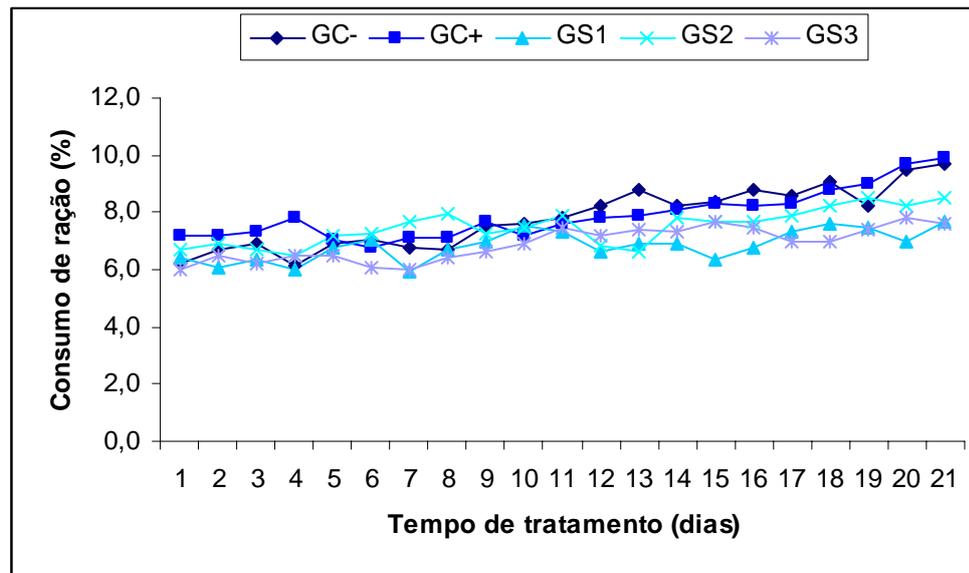


Gráfico 5. Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de acasalamento, tratados com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+) durante os 21 dias do período de acasalamento. Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5).

5.1.6. Consumo de água dos ratos durante os 21 dias de acasalamento

O Gráfico 6 mostra o consumo de água em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de tratamento durante o acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g), dos ratos tratados por via oral com o fitoterápico Soyfemme® (GS), em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,087].

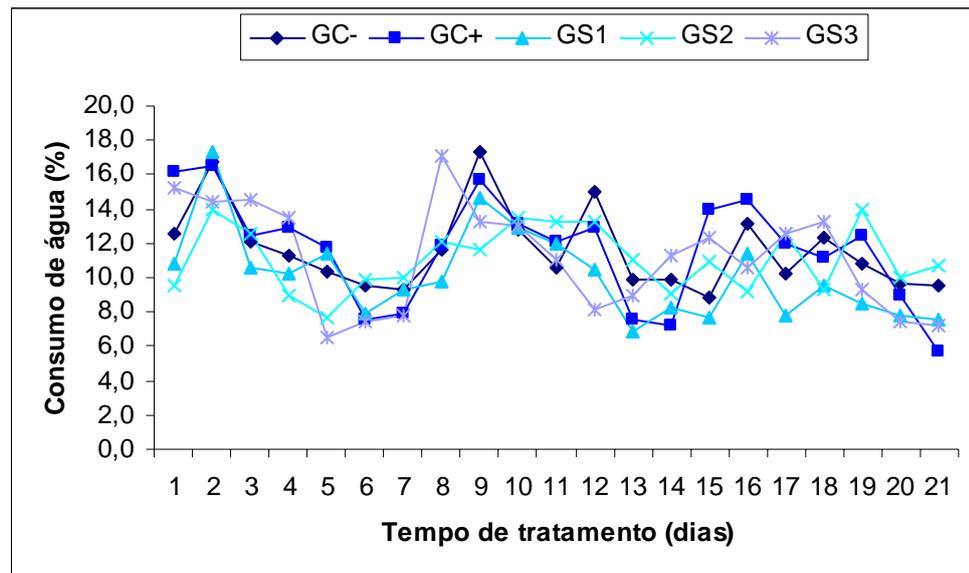


Gráfico 6. Consumo percentual de água dos ratos (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de acasalamento, tratados com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5).

5.1.7. Massa relativa de órgãos dos ratos

A Tabela 1 apresenta a massa relativa dos órgãos dos ratos tratados por via oral com o extrato do fitoterápico Soyfemme® (GS) em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle (GC-) e um grupo controle positivo (GC+) durante 91 dias consecutivos. Observou-se que houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação à massa corporal dos órgãos sexuais, e também do fígado dos animais. [ANOVA: p (fígado) = 0,027; p (coração) = 0,229; p (baço) = 0,874; p (rim direito) = 0,120; p (rim esquerdo) = 0,343; p (epidídimo direito) = 0,004; p (epidídimo esquerdo) = 0,002; p (testículo direito) = 0,148; p (testículo esquerdo) = 0,142; p (vesícula seminal) = 0,032 e p (próstata) = 0,714].

Com a utilização do teste de Bonferroni, pode-se observar que GS2 e GS3 foram diferentes estatisticamente de GC-, no peso de epidídimos direitos e esquerdos, no peso da vesícula seminal e também no peso do fígado.

Tabela 1. Massa relativa dos órgãos (%) dos machos tratados durante 91 dias com Soyfemme® (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). São apresentados os valores médios e o erro padrão médio (epm) por grupo.

Órgãos	GC- (n = 8)	GC+ (n = 5)	GS1 (n = 8)	GS2 (n = 6)	GS3 (n = 5)
Coração	0,07 ± 0,07	1,02 ± 0,05	1,06 ± 0,03	0,92 ± 0,03	0,96 ± 0,06
Baço	0,78 ± 0,05	0,76 ± 0,07	0,77 ± 0,06	0,67 ± 0,06	0,77 ± 0,08
Fígado	12,87 ± 0,8	11,96 ± 0,9	12,50 ± 0,5	10,12 ± 0,7*	10,01 ± 0,2*
Rim D	1,16 ± 0,08	1,25 ± 0,06	1,11 ± 0,03	1,02 ± 0,05	1,07 ± 0,07
Rim E	1,14 ± 0,08	1,18 ± 0,06	1,10 ± 0,05	1,00 ± 0,04	1,06 ± 0,05
Testículo D	1,75 ± 0,06	1,79 ± 0,07	1,67 ± 0,05	1,52 ± 0,05	1,55 ± 0,07
Testículo E	1,75 ± 0,06	1,76 ± 0,05	1,68 ± 0,04	1,56 ± 0,04	1,53 ± 0,08
Epidídimo D	0,76 ± 0,05	0,62 ± 0,02	0,68 ± 0,03	0,56 ± 0,02*	0,57 ± 0,04*
Epidídimo E	0,74 ± 0,04	0,62 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,55 ± 0,01*	0,57 ± 0,03*
Próstata	0,81 ± 0,06	0,83 ± 0,09	0,56 ± 0,04	0,67 ± 0,06	0,68 ± 0,09
Vesícula seminal	0,67 ± 0,10	0,63 ± 0,10	0,78 ± 0,14	0,56 ± 0,07*	0,58 ± 0,06*

* Diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

5.1.8. Número total de espermatozóides

O Gráfico 7 mostra os valores médios do número de espermatozóides presentes na cauda do epidídimo dos animais de cada grupo, determinado a partir da contagem dos espermatozóides presentes em uma alíquota do macerado dos epidídimos na câmara de Neubauer (GC- = 8; GC+ = 5; GS1 = 8; GS2 = 6; GS3 = 5). Com base nos resultados, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos [ANOVA: $p = 0,038$]. Com a realização do teste de Bonferroni, conclui-se que os grupos GS3 e GC+ são estatisticamente diferente do grupo GC-.

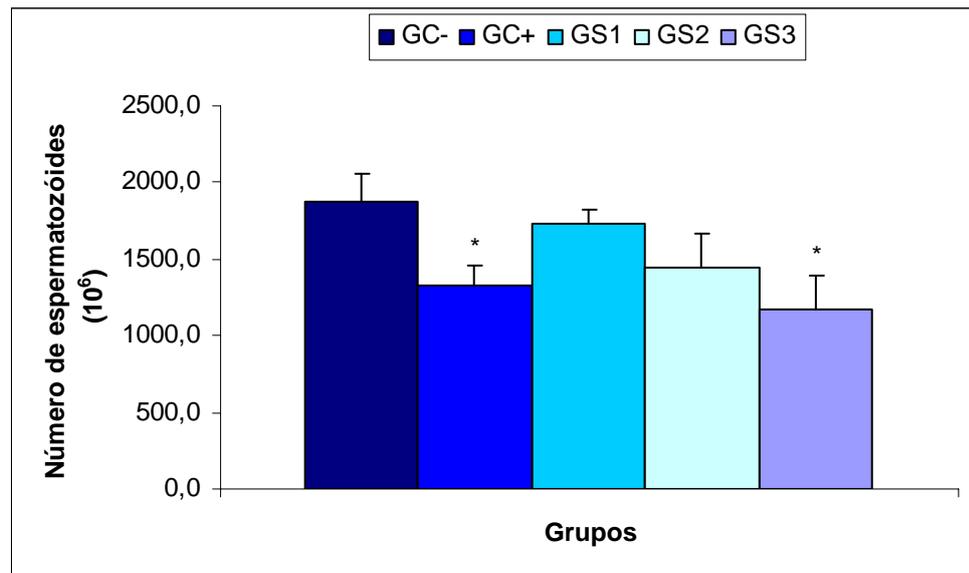


Gráfico 7. Número de espermatozoides presentes na cauda do epidídimo de ratos tratados durante 91 dias com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3, 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo e as barras verticais representam o erro padrão médio (epm) * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$).

5.1.9. Produção diária de espermatozoides

O Gráfico 8 mostra os valores médios da produção diária de espermatozoides, mensurada a partir da contagem de células espermáticas em câmara de Neubauer, a partir dos macerados dos testículos dos animais de cada grupo (GC- = 8, GC+ = 5, GS1 = 8, GS2 = 6 e GS3 = 5). Com base nos resultados, verificou-se que o GS1 foi diferente estatisticamente do grupo controle negativo e dos demais grupos tratados. (ANOVA $p = 0,013$; Teste de Bonferroni).

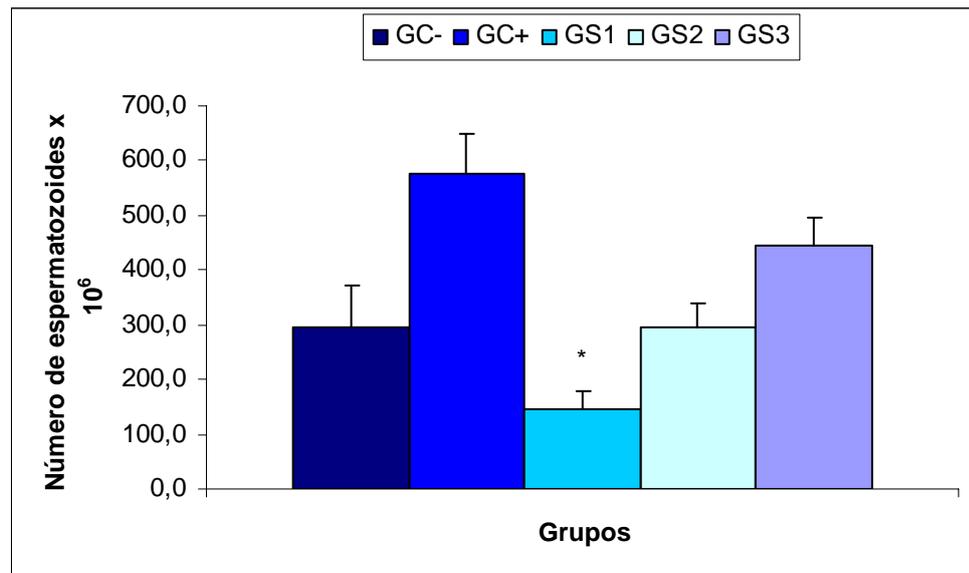


Gráfico 8. Produção diária de espermatozoides de ratos tratados durante 91 dias com o Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo e as barras verticais representam o erro padrão médio (epm). * Valor estatisticamente diferente em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

5.1.10. Morfologia espermática

O Gráfico 9 mostra o número médio de espermatozoides com alterações morfológicas em cada grupo, determinado a partir da avaliação do lavado proveniente do ducto deferente de todos os animais (GC- = 8, GC+ = 5, GS1 = 8, GS2 = 6 e GS3 = 5). O percentual de alterações morfológicas em cada grupo foi de 6 % para GC-, 8,8 % para GC+, 13,3 % para GS1, 19,7% para GS2 e 22,6% para GS3. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos [Teste Qui-quadrado: $p = 0,0004$; Teste de Bonferroni] Verifica-se que os três grupos tratados com Soyfemme e o grupo controle positivo são estatisticamente diferentes do grupo controle negativo.

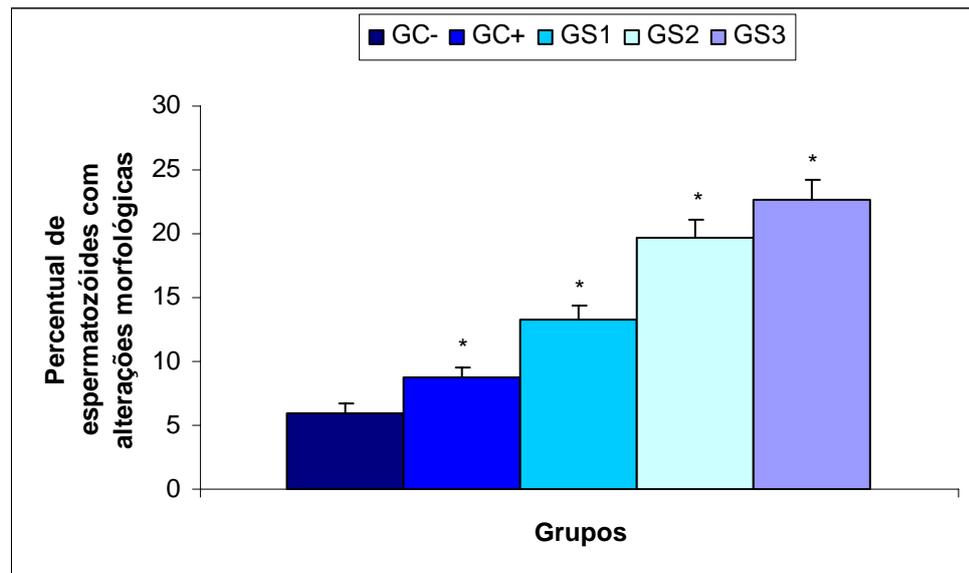


Gráfico 9. Número de espermatozoides com alterações morfológicas nos ratos tratados durante 91 dias com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo e as barras verticais representam o erro padrão médio (epm). Os valores representam a média dos grupos e as barras verticais representam o epm. * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$).

5.1.11. Desenvolvimento ponderal das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento

O Gráfico 10 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 14 dias de tratamento prévios ao acasalamento, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) das ratas tratadas por via oral com Soyfemme® (GS), em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que os grupos GC-, GC+ e GS1 apresentaram um ganho relativo de massa corporal durante esse período sem diferença estatística significativa, no entanto GS2 e GS3 diferiram estatisticamente de GC- (ANOVA de MR: 0,0021; Teste de Bonferroni).

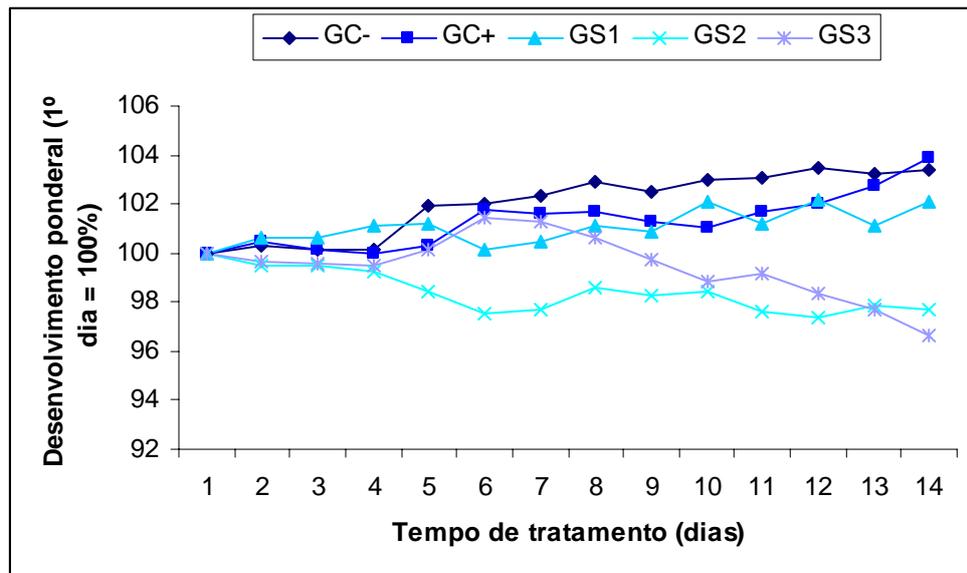


Gráfico 10. Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante a fase de pré-acasalamento com o Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GS1 = 24; GS2 = 21; GS3 = 11).

5.1.12. Consumo de água das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento

O Gráfico 11 mostra o consumo de água em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 14 dias de tratamento prévios ao acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Soyfemme® (GS) com três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Observou-se que tanto os animais dos grupos controles e os tratados com o fitoterápico, apresentaram um consumo relativo de água (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,121].

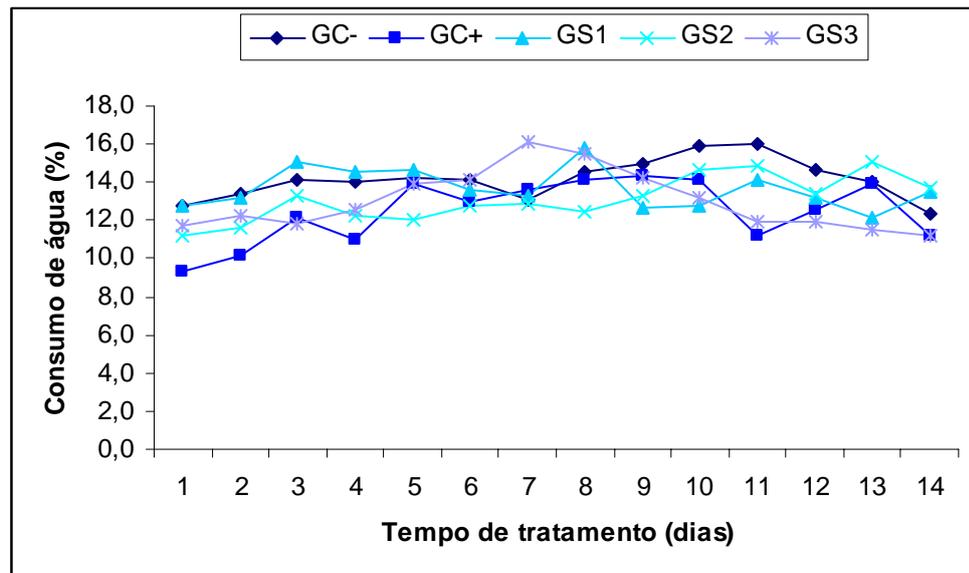


Gráfico 11. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 14 dias prévios ao acasalamento, de ratas tratadas com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GS1 = 24; GS2 = 21; GS3 = 11).

5.1.13. Consumo de ração das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento

O Gráfico 12 mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 14 dias de tratamento prévios ao acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Soyfemme® (GS) em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo(GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verificou-se que tanto as ratas tratadas com o fitoterápico quanto as ratas dos grupos controles apresentaram um consumo relativo de ração (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,321].

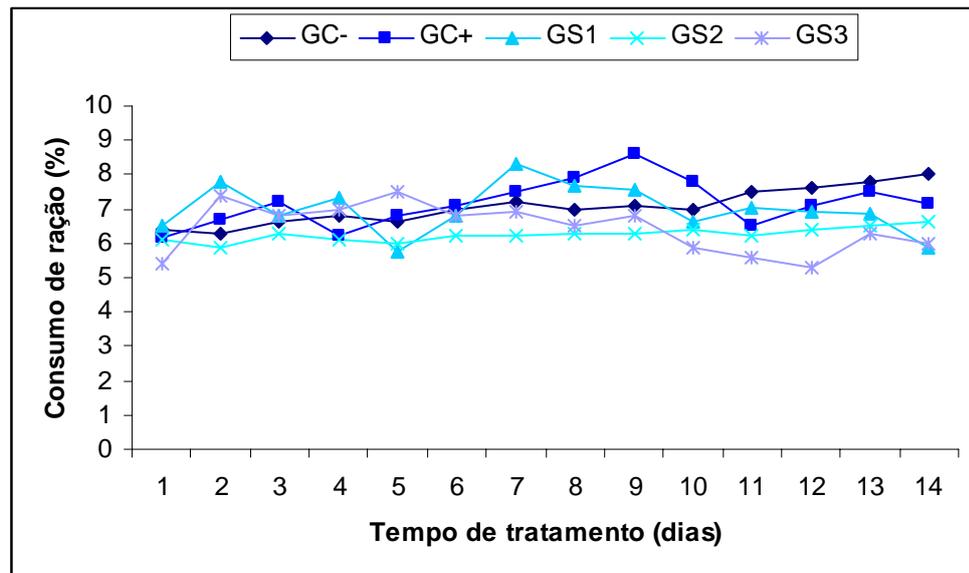


Gráfico 12. Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 14 dias prévios ao acasalamento, tratadas com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GS1 = 24; GS2 = 21; GS3 = 11).

5.1.14. Desenvolvimento ponderal das ratas durante a gestação

O Gráfico 13 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 21 dias de gestação, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) das ratas tratadas por via oral com Soyfemme® (GS), em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que todos os grupos apresentaram um ganho relativo de massa corporal durante esse período, porém com diferença estatística significativa. [ANOVA de MR: 0,004] Com a realização do teste de Bonferroni observou-se que GS2 e GS3 foram diferentes dos demais grupos. O ganho relativo médio dos grupos GC-, GC+ e GS1 foi de 36,5%, GS2 foi de 10% e GS3 o ganho médio foi de 20,2%.

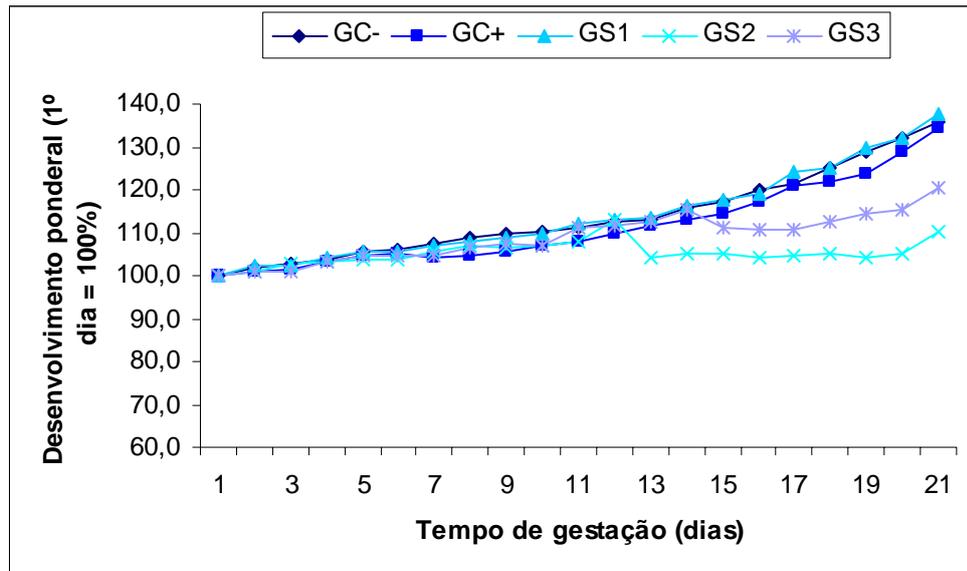


Gráfico 13. Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante a fase de gestação com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GS1 = 13; GS2 = 5; GS3 = 2).

5.1.15. Consumo de água das ratas durante a gestação

O Gráfico 14 mostra o consumo de água em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de gestação. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Soyfemme® (GS), com três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Observou-se que tanto os animais dos grupos controles negativo e positivo e os tratados com o fitoterápico, apresentaram um consumo relativo de água (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,203].

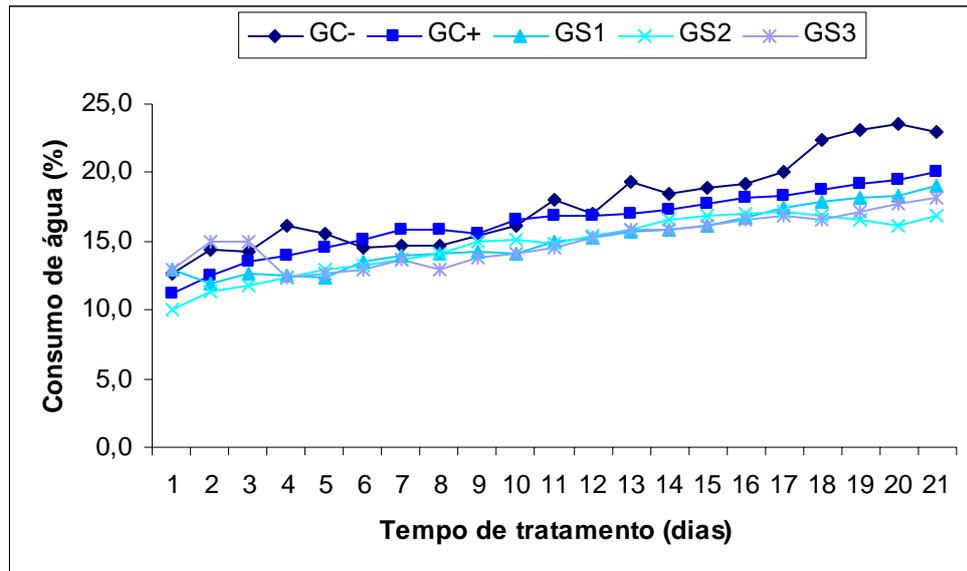


Gráfico 14. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, de ratas tratadas com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GS1 = 13; GS2 = 5; GS3 = 2).

5.1.16. Consumo de ração das ratas durante a gestação

O Gráfico 15 mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de gestação. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Soyfemme® (GS) em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verificou-se que tanto as ratas tratadas com o fitoterápico quanto as ratas dos grupos controles apresentaram um consumo relativo de ração (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p =0,124].

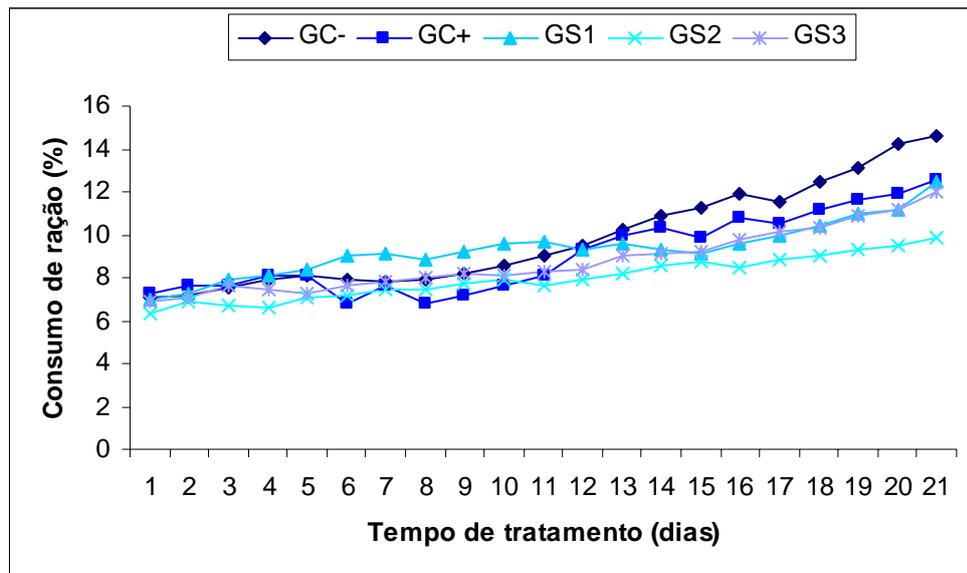


Gráfico 15. Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, tratadas com Soyfemme (GS) em três diferentes dosagens, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GS1 = 13; GS2 = 5; GS3 = 2).

5.1.17. Desenvolvimento ponderal das ratas durante a lactação

O Gráfico 16 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 21 dias de lactação, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) das ratas tratadas por via oral com Soyfemme® (GS), em duas doses diferentes 4,3 e 43mg.kg⁻¹, (GS1 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que todos os grupos apresentaram um ganho relativo de massa corporal durante esse período sem diferença estatística significativa. [ANOVA de MR: 0,098].

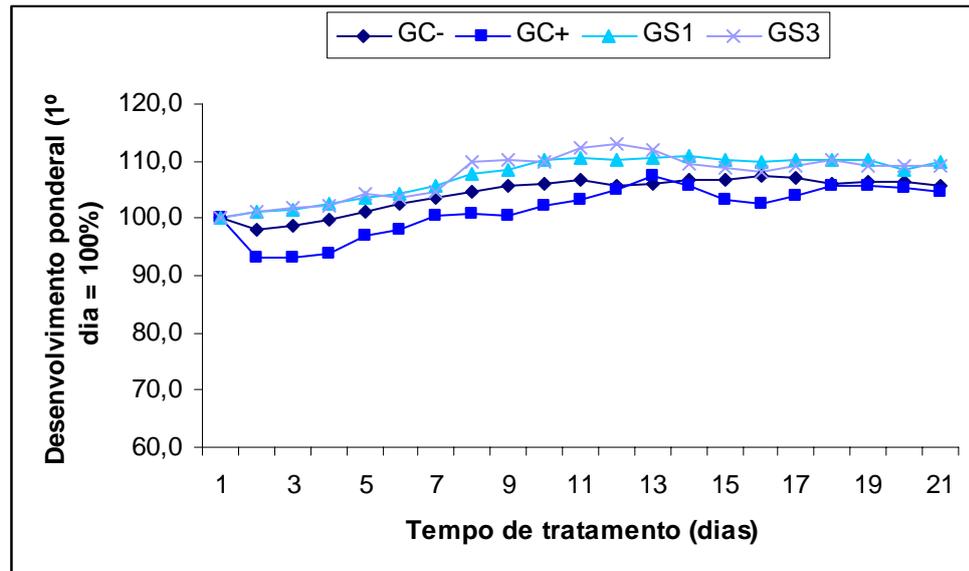


Gráfico 16. Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante os 21 dias de lactação com Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 5; GC+ = 1; GS1 = 3; GS3 = 1).

5.1.18. Consumo de água das ratas durante a lactação

O Gráfico 17 mostra o consumo de água em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de lactação. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Soyfemme® (GS), com duas doses diferentes 4,3 e 43mg.kg⁻¹, (GS1 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Observou-se que tantos os animais dos grupos controles e os tratados com o fitoterápico, apresentaram um consumo relativo de água (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0141].

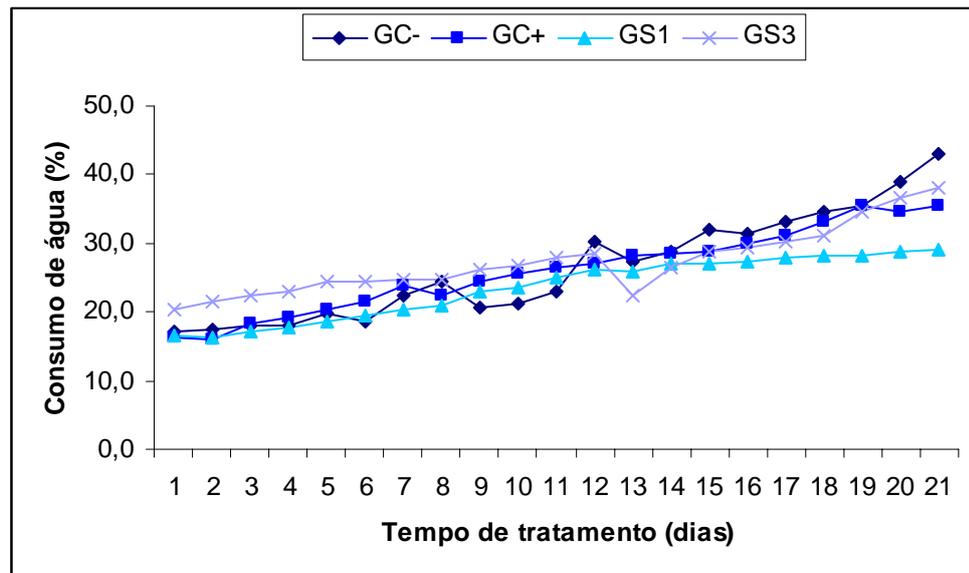


Gráfico 17. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de lactação, de ratas tratadas com Soyfemme (GS) em duas dosagens, 4,3 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 5; GC+ = 1; GS1 = 3; GS3 = 1).

5.1.19. Consumo de ração das ratas durante a lactação

O Gráfico 18 mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de lactação. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Soyfemme® (GS) em duas doses diferentes 4,3 e 43mg.kg⁻¹, (GS1 e GS3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verificou-se que tanto as ratas tratadas com o fitoterápico quanto as ratas dos grupos controles apresentaram um consumo relativo de ração (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,158].

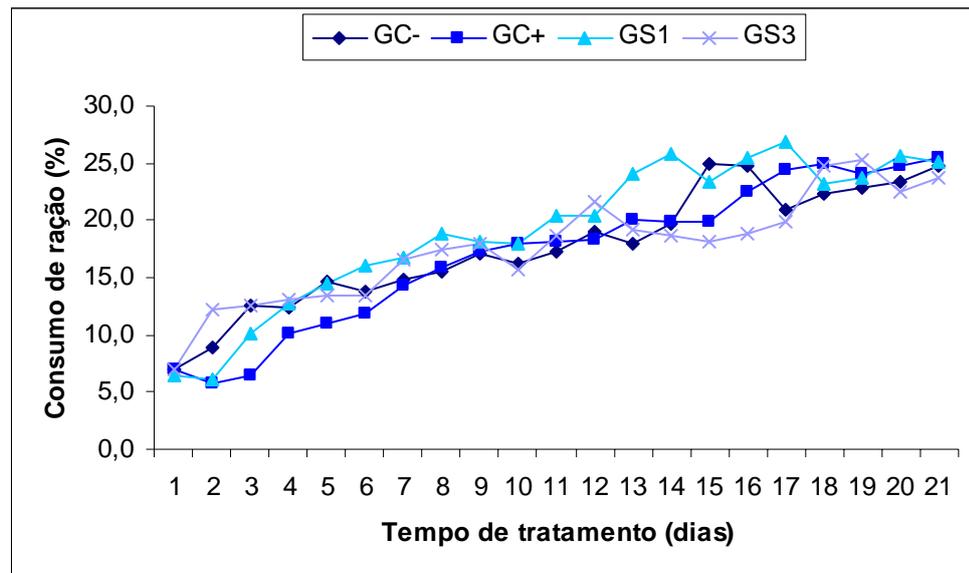


Gráfico 18. Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de lactação, tratadas com Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 5; GC+ = 1; GS1 = 3; GS3 = 1).

5.1.20. Massa relativa de órgãos das ratas

A Tabela 2 apresenta a massa relativa dos órgãos das ratas tratadas por via oral com o fitoterápico Soyfemme® (GS) que pariram a termo, em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle (GC-) e um grupo controle positivo (GC+) durante as fases de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.

Observou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação à massa corporal dos órgãos sexuais, nem nos demais órgãos enviados para análise histopatológica. (ANOVA = $p > 0,05$).

Tabela 2. Massa relativa dos órgãos (%) das fêmeas tratadas durante as fases de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação com Soyfemme (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GS1, GS2 e GS3, respectivamente) um grupo controle (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). São apresentados os valores médios e o erro padrão médio (epm) por grupo.

Órgãos	GC- (n = 7)	GC+ (n = 1)	GS1 (n = 5)	GS2 (n = 2)	GS3 (n = 1)
Coração	0,73 ± 0,02	0,81 ± 0,04	0,79 ± 0,03	0,77 ± 0,04	0,80 ± 0,02
Baço	0,47 ± 0,01	0,51 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,52 ± 0,02	0,61 ± 0,02
Fígado	10,31 ± 0,33	12,23 ± 0,45	10,29 ± 0,47	9,74 ± 0,36	8,85 ± 0,14
Rim D	0,84 ± 0,01	0,92 ± 0,03	0,89 ± 0,01	0,76 ± 0,02	0,89 ± 0,02
Rim E	0,80 ± 0,03	0,90 ± 0,03	0,83 ± 0,02	0,74 ± 0,03	0,43 ± 0,03
Ovário D	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Ovário E	0,07 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Útero	0,37 ± 0,11	0,38 ± 0,02	0,48 ± 0,04	0,42 ± 0,03	0,41 ± 0,05

5.1.21. Índices reprodutivos dos animais tratados

A Tabela 3 apresenta os índices reprodutivos dos animais tratados (antes e durante o acasalamento e durante a gestação) com o fitoterápico Soyfemme® (GS) em três diferentes doses 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-).

Com relação à análise das taxas calculadas, houve diferença estatística significativa entre os grupos nas taxas de acasalamento, gestação e perdas pós-implantação [teste Qui-quadrado: p = 0,0004 (taxa acasalamento), p = 0,0003 (taxa de gestação) p = 0,004 (taxa de perdas pós-implantação)] verificou-se que GC+ diferiu estatisticamente na taxa de gestação, e GS3 diferiu estatisticamente dos demais grupos, nas taxas de acasalamento e taxa pós-implantação.

Tabela 3. Índices reprodutivos de ratas tratadas com o fitoterápico Soyfemme (GS). São apresentados os valores do número de observações indicados (n) e as taxas em valores percentuais.

Índices reprodutivos	GC-	GC+	GS1	GS2	GS3
Fêmeas acasaladas (n)	24	12	24	10	10
Machos acasalados (n)	8	5	8	7	5
Fêmeas com esfregaço vaginal positivo	18	5	13	7	3
Fêmeas prenhes (n)	13	1	12	7	3
Taxa de acasalamento (%)	69,2	45,5	46,5	70	30*
Taxa de gestação (%)	81,25	20*	92,3	100	66,6
Taxa de perdas pós-implantação (%)	0	0	3,6	4	21*

* Diferença estatística significativa (p < 0,01)

A Tabela 4 apresenta os índices reprodutivos das fêmeas tratadas com o fitoterápico Soyfemme (GS) em três diferentes doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-) que pariram a termo. A massa corporal (g) no nascimento bem como o número médio de filhotes não mostrou diferença estatisticamente significativa [ANOVA p > 0,05]. Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo nas taxas reprodutivas, na taxa de parto, taxa de viabilidade e taxa de desmame o grupo GS2, se mostrou diferente do grupo controle negativo e dos demais grupos comparados e GS3 se mostrou diferente apenas na taxa de desmame. [Teste Qui-Quadrado p < 0,01].

Tabela 4. Índices reprodutivos de ratas tratadas com Soyfemme® (GS) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-) e que pariram à termo. São apresentados os valores médios ± epm do número de observações indicados (n) e as taxas em valores percentuais.

Índices Reprodutivos	GC-	GC+	GS1	GS2	GS3
N (progenitoras) Filhotes	(7) 47	(1) 8	(5) 36	(2) 13	(2) 15
Número de filhotes/ninhada	10,2 ± 1,6	8	10,2±0,8	7,3 ± 1,8	7,5 ± 1,8
Massa corporal dos filhotes(g)	5,6 ± 0,14	5 ± 0,01	6 ± 0,2	5,4 ± 0,3	6 ± 0,5
Taxa de parto (%)	100%	100%	100%	50%*	100%
Taxa de natalidade (%)	100%	100%	87,5%	83%	100%
Taxa de viabilidade (%)	100%	100%	97,7%	60%*	100%
Taxa de desmame (%)	98,4%	100%	95,3%	0%*	61,5%*

* Diferença estatística significativa (p < 0,01)

A Tabela 5 apresenta os índices reprodutivos das fêmeas tratadas com o fitoterápico Soyfemme® (GS) em duas diferentes doses, 4,3 e 21,5 mg.kg⁻¹ comparados a um grupo controle negativo (GC-) que sofreram cesariana no 21º dia de gestação. A massa corporal (g) dos fetos no momento da cesariana e a média do número de fetos por ninhada não mostraram diferença estatisticamente significativa [ANOVA p = 0,152]. O número de filhotes e a massa do útero gravídico do GS2 foram diferente estatisticamente dos demais grupos [ANOVA p = 0,023; Bonferroni].

Tabela 5. Índices reprodutivos de ratas tratadas com Soyfemme® (GS) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ comparados a um grupo controle negativo (GC-) e que sofreram cesareana no 21º dia de gestação. São apresentados os valores médios ± epm do número de observações indicados (n).

Índices reprodutivos	GC-	GS1	GS2
N (progenitoras) filhotes	(5) 61	(8) 69	(3) 22*
Massa do útero grávido (g)	68,35 ± 8,0	74,24 ± 4,6	33,05 ± 9,2*
Número de fetos/ninhada	10,2 ± 1,6	10,2 ± 0,8	7,3 ± 1,8
Massa corporal dos fetos (g)	4,8 ± 0,1	5,11 ± 0,05	3,5 ± 0,8
Alterações macroscópicas externas nos fetos	-	-	-

* Diferença estatística significativa (p < 0,05)

5.1.22. Desenvolvimento ponderal das progênes

O Gráfico 19 mostra o desenvolvimento ponderal (g) das progênes de ratas tratadas com o fitoterápico Soyfemme® durante o período prévio ao acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.

Verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,095].

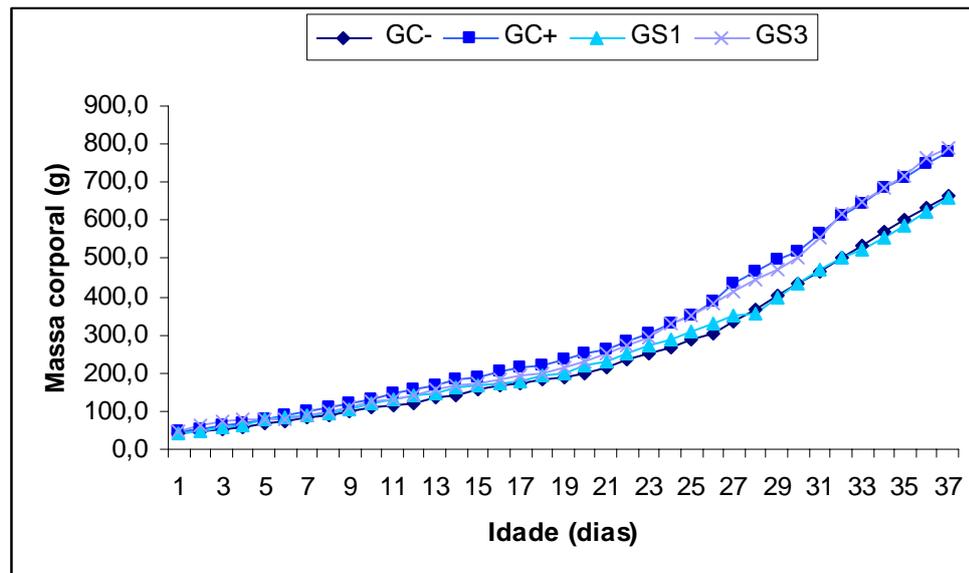


Gráfico 19. Desenvolvimento ponderal (g) das progênes desde o nascimento até o 36º dia, nascidos de ratas tratadas com o Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos.

O Gráfico 20 mostra o desenvolvimento ponderal (g) individual das progênes de ratas tratadas com o fitoterápico Soyfemme® durante o período prévio ao acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.

Verificou-se que os filhotes do grupo GS3 apresentaram um desenvolvimento ponderal diferente, havendo diferença estatisticamente significativa entre GS3 e os outros grupos na 5ª semana de vida. [ANOVA de MR $p = 0,04$; Teste de Bonferroni].

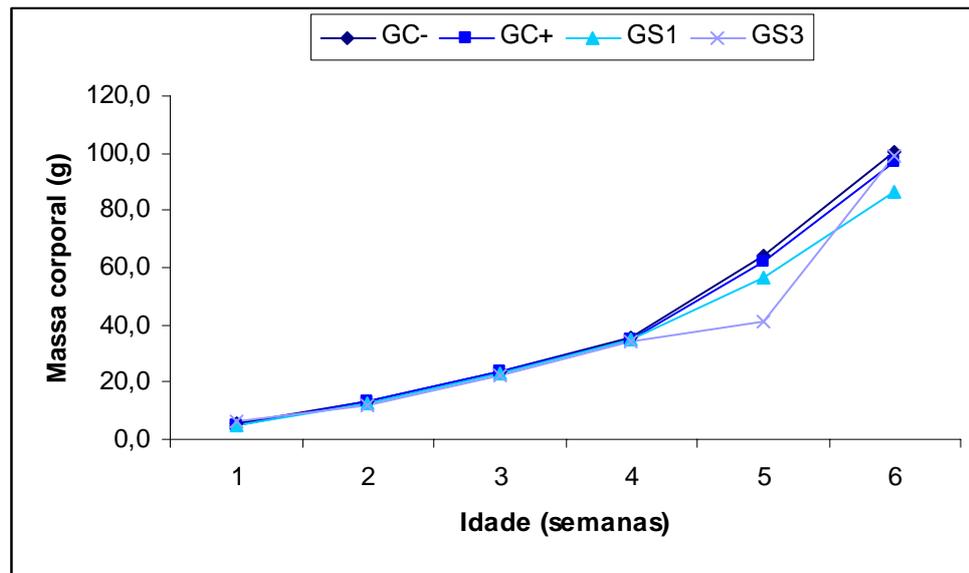


Gráfico 20. Desenvolvimento ponderal (g) individual das progêneses desde o nascimento até o 36º dia, nascidos de ratas tratadas com o Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos.

5.1.23. Características de desenvolvimento das progêneses

O Gráfico 21 e o Gráfico 22 mostram a idade (dias de vida) no surgimento das características de desenvolvimento geral e sexual, respectivamente, nos filhotes nascidos de ratas tratadas com o fitoterápico Soyfemme® em três doses diferentes, um grupo controle positivo e um grupo controle negativo. As características de desenvolvimento se manifestaram em períodos correspondentes aos do grupo controle negativo.

O Gráfico 21 apresenta a idade (dias de vida) dos filhotes no aparecimento das características de desenvolvimento geral. O Gráfico 21A mostra descolamento dos pavilhões auriculares surgiu no mesmo período em todos os grupos experimentais, entre o primeiro e o terceiro dia de vida. [Teste Qui-Quadrado $p = 1,2$]. O Gráfico 21B mostra o surgimento da penugem, que ocorreu entre o terceiro o sexto dia de vida em todos os grupos [Teste Qui-Quadrado $p = 1$]. A erupção dos dentes incisivos é representada no Gráfico 21C, ocorreu entre o sexto e o oitavo dia e entre o oitavo e o décimo dia, o surgimento do pelo se deu entre o sétimo e nono dia como mostra o Gráfico 21D (Figura 6) [Teste Qui-Quadrado $p = 1$]. A abertura dos olhos expressa no Gráfico 21E ocorreu entre os dias 11º e 14º [Teste Qui-Quadrado $p = 1,1$].

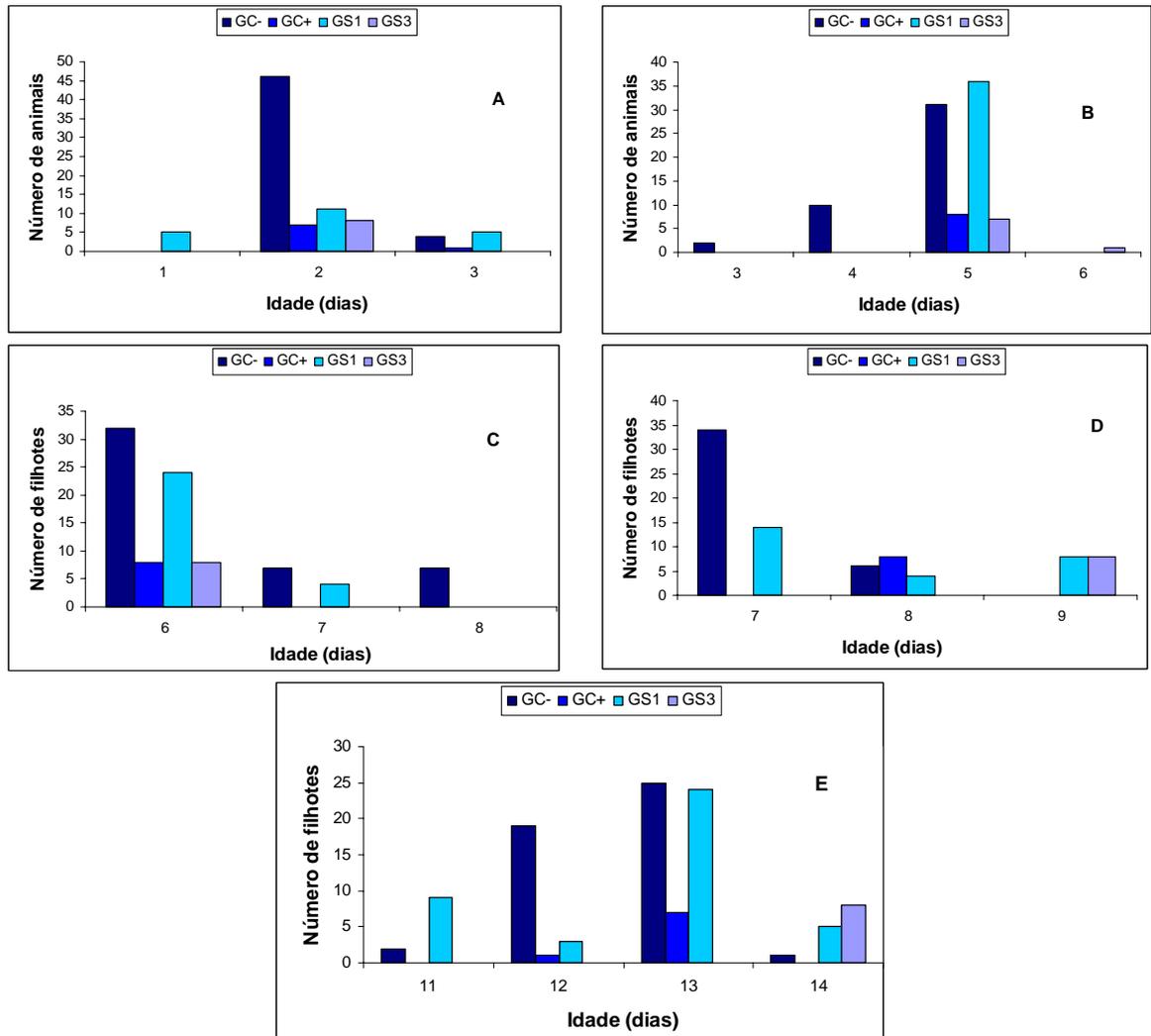


Gráfico 21. Idade em dias do aparecimento das características de desenvolvimento geral das progênes de ratas tratadas com o Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.

O Gráfico 22 mostra a idade (dias de vida) dos filhotes no aparecimento das características de desenvolvimento sexual (descida dos testículos, separação prepucial e abertura do canal vaginal). A descida dos testículos representada no Gráfico 22A ocorreu entre o 15º e 19º dia de vida em todos os grupos experimentais. [Teste Qui-Quadrado $p = 0,898$]. No Gráfico 22B está representada a separação prepucial, que ocorreu entre o 34º e o 39º dia de vida [Teste Qui-Quadrado $p = 1$]. A abertura do canal vaginal, expressa no Gráfico 22C, ocorreu entre o 30º e 37º dia de vida. [Teste Qui-Quadrado $p = 0,941$].

Nenhuma das variáveis, tanto das características de desenvolvimento geral, quanto às características de desenvolvimento sexual apresentaram diferença estatisticamente significativa.

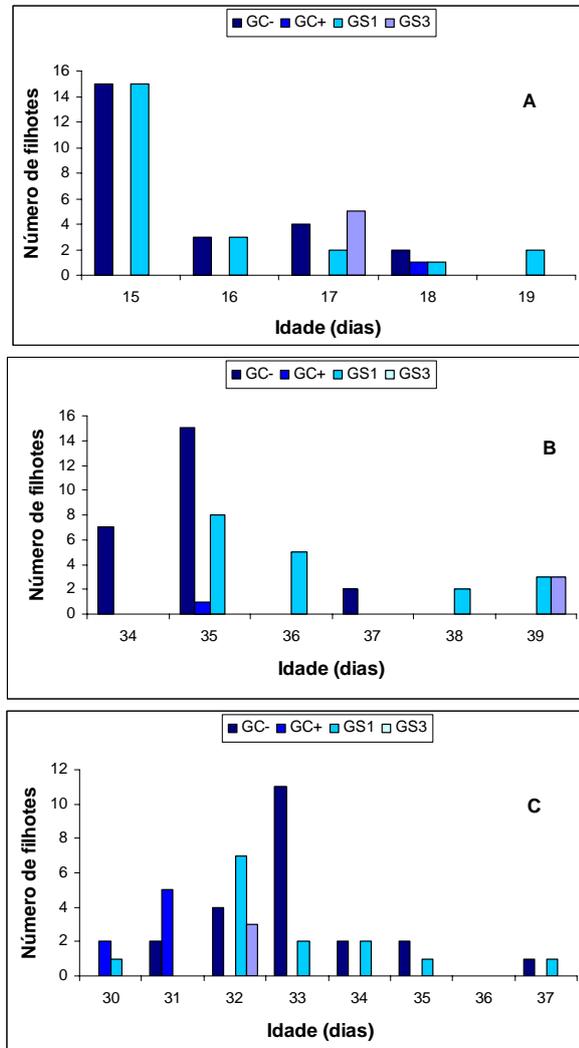


Gráfico 22. Idade em dias do aparecimento das características de desenvolvimento sexual das progênes de ratas tratadas com o Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.



Figura 6. Surgimento do pelo e erupção dos incisivos, no oitavo dia de vida.

5.1.24. Registro de comportamento em campo aberto

O Gráfico 23 representa o registro de comportamento em campo aberto dos filhotes de ratas tratadas com Soyfemme (GS) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), aos 75 dias de vida. Em relação ao número de entradas no centro do campo aberto não houve diferença estatisticamente significativa, todos os grupos testados entraram e permaneceram no centro da caixa de campo aberto [ANOVA p = 0,123]. O Gráfico também mostra a frequência de locomoção total no campo aberto, os grupos não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si [ANOVA p = 0,114]. A frequência do comportamento de “rearing”, expressada no gráfico, não foi estatisticamente diferente entre os grupos [ANOVA p = 0,213]. O Gráfico 23 também mostra o comportamento de “escanear”. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos testados [ANOVA p = 0,097].

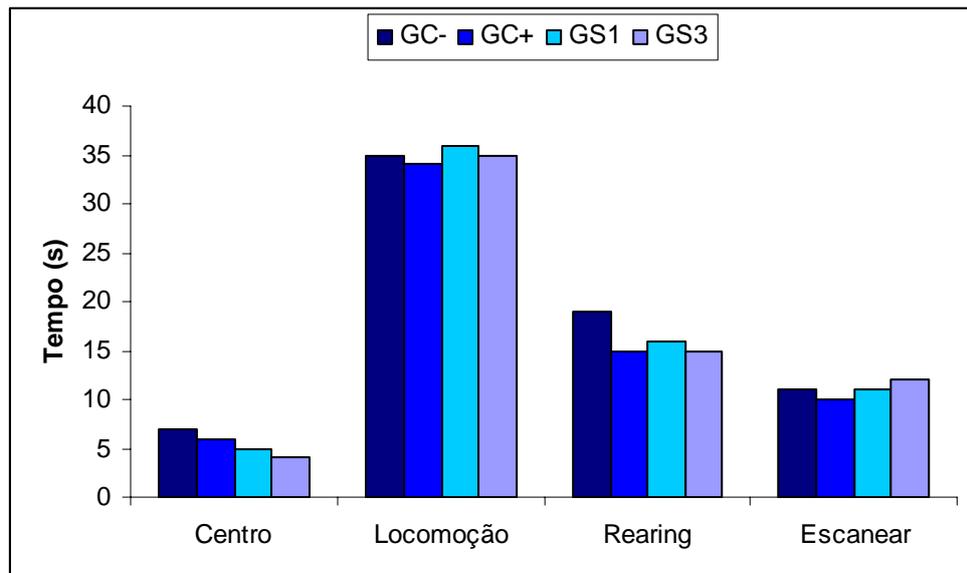


Gráfico 23. Freqüência de entrada no centro do campo aberto, tempo de locomoção total dentro da caixa, comportamento de “rearing” e comportamento de “escanear”. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. (GC- n = 2; GC+ n = 2; GS1 n = 2; GS3 n = 2).

5.2. GRUPO TRATADO COM A FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA ISOFLAVINE

5.2.1. Desenvolvimento ponderal dos ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento

O Gráfico 24 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 70 dias de tratamento prévios ao acasalamento, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) dos ratos tratados por via oral com o fitoterápico Isoflavine® (GI), em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que todos os grupos apresentaram um ganho relativo de massa corporal durante esse período sem diferença estatística significativa. (ANOVA de MR: p = 0,154).

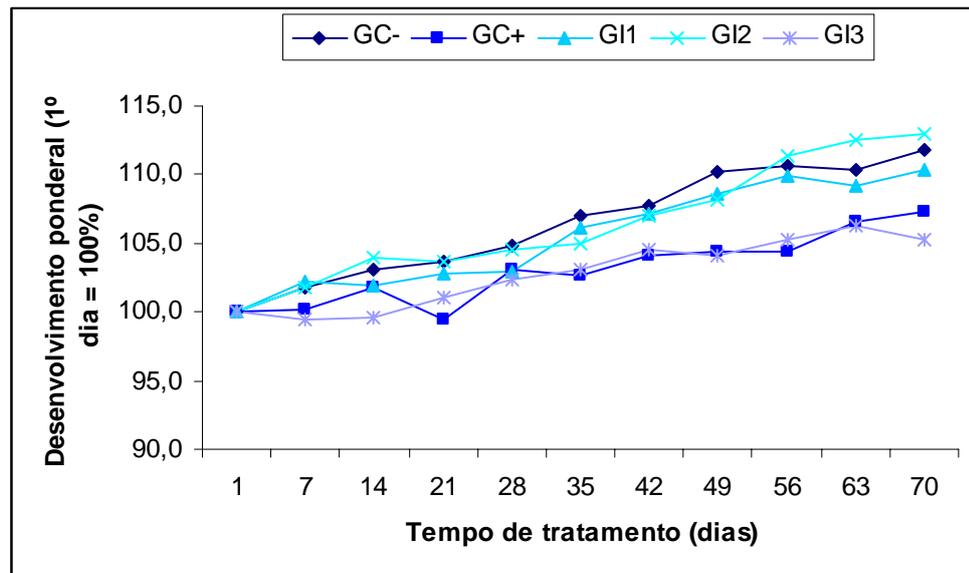


Gráfico 24. Desenvolvimento ponderal de ratos do (1º dia = 100%) tratados com Isoflavine (GI) em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3).

5.2.2. Consumo de água dos ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento

O Gráfico 25 mostra o consumo de água em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 70 dias de tratamento prévios ao acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g) de ratos tratados diariamente por via oral com o fitoterápico Isoflavine® (GI), com três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, GI1, GI2 e GI3, respectivamente, um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,003]. Com a realização do teste de Bonferroni, conclui-se que o consumo de água foi diferente no grupo GS3, que apresentou diferença significativa de todos os outros grupos.

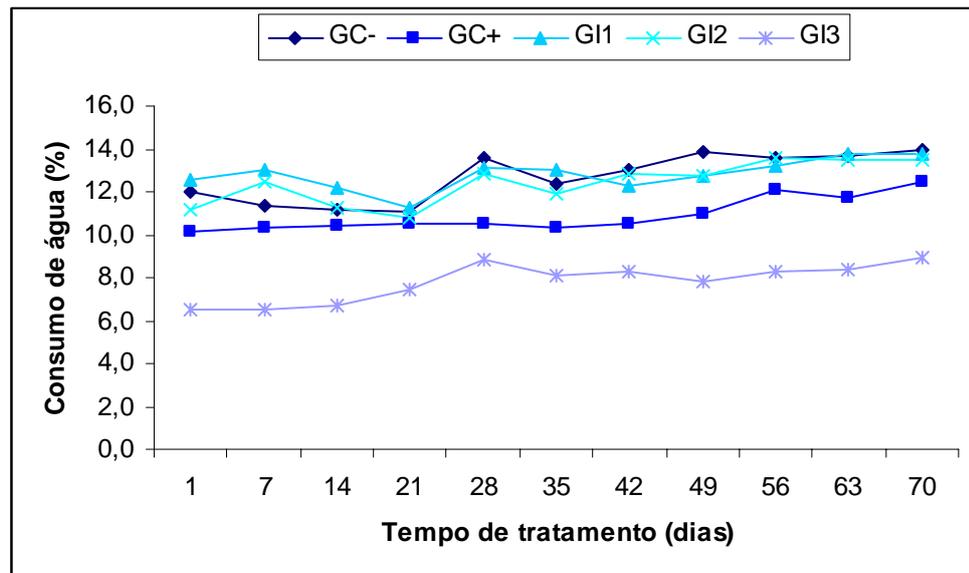


Gráfico 25. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 70 dias prévios ao acasalamento, tratados com Isoflavine (GI), em três diferentes doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3).

5.2.3. Consumo de ração dos ratos durante os 70 dias prévios ao acasalamento

O Gráfico 26 mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 70 dias de tratamento prévios ao acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g), de ratos por via oral com Isoflavine® (GI), em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, GI1, GI2 e GI3, respectivamente, um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que tanto os ratos tratados com o fitoterápico quanto os ratos do grupo controle, apresentaram um consumo relativo de ração (%) semelhante. Observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,274].

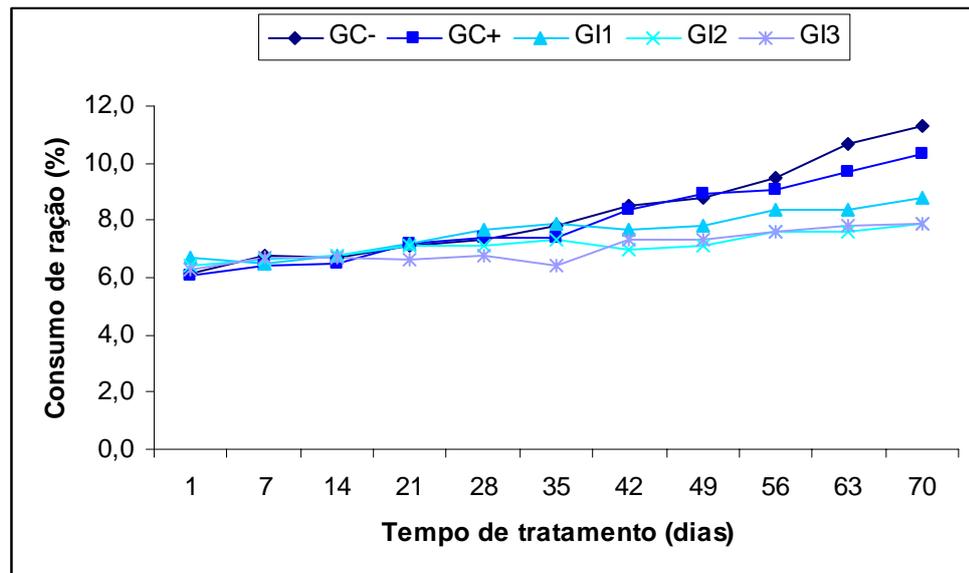


Gráfico 26. Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal durante os 70 dias prévios ao acasalamento, de ratos tratados com Isoflavine (GI), em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3).

5.2.4. Desenvolvimento ponderal dos ratos durante os 21 dias de acasalamento

O Gráfico 27 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante 21 dias do período de acasalamento, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) dos ratos tratados por via oral com o fitoterápico Isoflavine® (GI), em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, GI1, GI2 e GI3, respectivamente, um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,431].

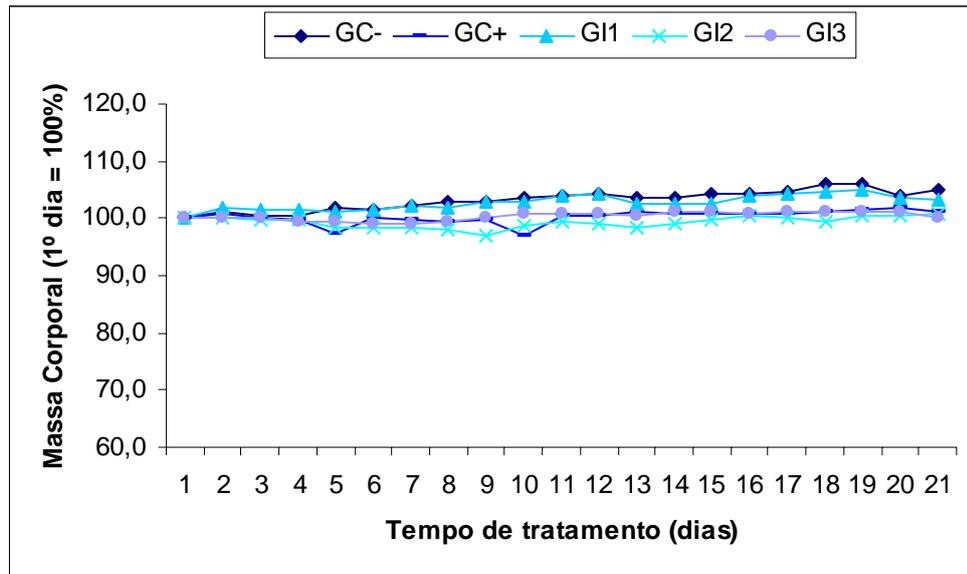


Gráfico 27. Desenvolvimento ponderal de ratos (1º dia = 100%) durante os 21 dias de acasalamento, tratados com Isoflavine (GI), em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3).

5.2.5. Consumo de ração dos ratos durante os 21 dias de acasalamento

O Gráfico 28 mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), avaliado nos 21 dias durante o período de acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g), de ratos tratados por via oral com Isoflavine® (GI), com três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que tanto os ratos tratados com o fitoterápico quanto os ratos do grupo controle negativo e positivo, apresentaram flutuações no consumo relativo de ração (%). Verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,074].

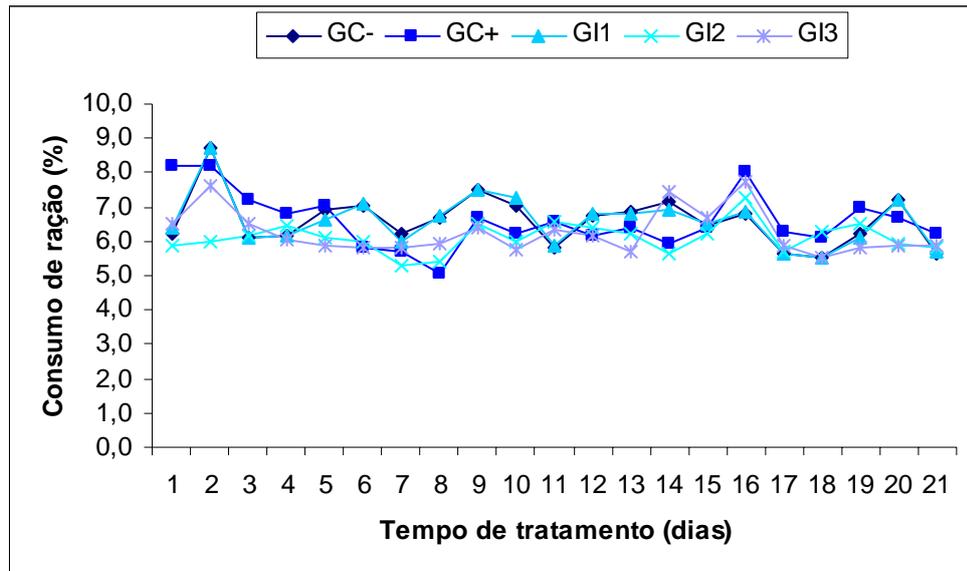


Gráfico 28. Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de acasalamento, tratados com Isoflavine (GI), em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3).

5.2.6. Consumo de água dos ratos durante os 21 dias de acasalamento

O Gráfico 29 mostra o consumo de água em relação à massa corporal dos ratos (%), avaliado durante os 21 dias de tratamento durante o acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g), de ratos tratados com o fitoterápico Isoflavine® (GI), em três doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Houve flutuações dentro dos grupos, no entanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,122].

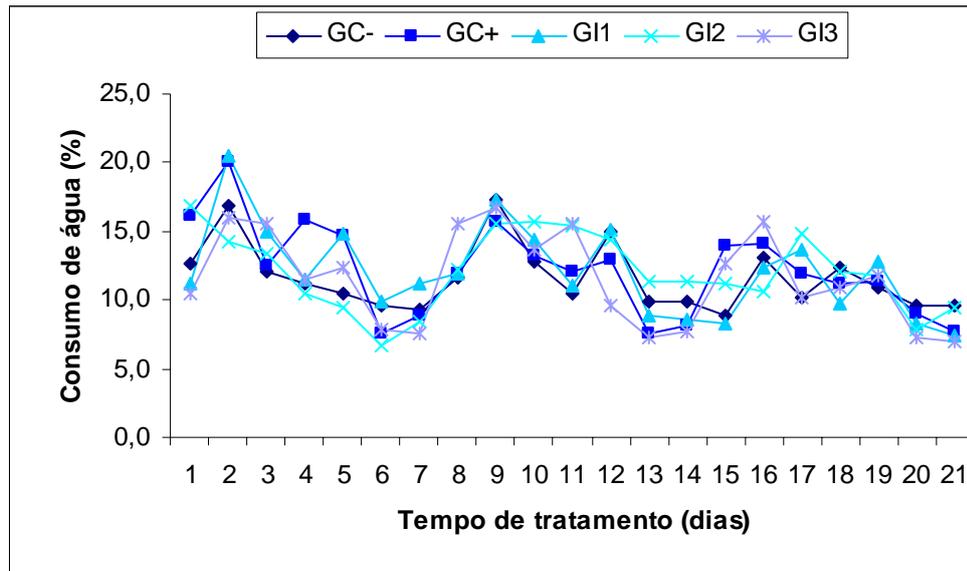


Gráfico 29. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de acasalamento, de ratos tratados com Isoflavine (GI) em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3).

5.2.7. Massa relativa de órgãos dos ratos

A Tabela 6 apresenta a massa relativa dos órgãos dos ratos tratados diariamente por via oral com o fitoterápico Isoflavine® (GI) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+), durante 91 dias consecutivos. Observou-se que houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação à massa corporal de um órgão sexual, mas não diferiu estatisticamente nos demais órgãos avaliados. [ANOVA fator único: p (fígado) = 0,562; p (coração) = 0,468; p (baço) = 0,807; p (rim direito) = 0,658; p (rim esquerdo) = 0,737; p (epidídimo direito) = 0,045; p (epidídimo esquerdo) = 0,014; p (testículo direito) = 0,767; p (testículo esquerdo) = 0,506; p (vesícula seminal) = 0,689 e p (próstata) = 0,604].

Com a realização do teste de Bonferroni pôde-se observar que o peso dos epidídimos esquerdos e direitos nos grupos GI2 e GI3 diferiram estatisticamente do grupo controle negativo.

Tabela 6. Massa relativa dos órgãos (%) dos ratos tratados durante 91 dias com fitoterápico Isoflavine (GI) em três doses 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). São apresentados os valores médios e erro padrão médio (epm).

Órgãos	GC- (n = 8)	GC+ (n = 5)	GI1 (n = 8)	GI2 (n = 5)	GI3 (n = 3)
Coração	1,07 ± 0,07	1,02 ± 0,05	0,98 ± 0,03	0,97 ± 0,07	0,91 ± 0,04
Baço	0,78 ± 0,05	0,76 ± 0,07	0,69 ± 0,05	0,75 ± 0,02	0,77 ± 0,12
Fígado	12,87 ± 0,89	11,96 ± 0,97	10,31 ± 0,48	12,14 ± 0,62	10,71 ± 0,22
Rim D	1,16 ± 0,08	1,25 ± 0,06	1,14 ± 0,04	1,10 ± 0,07	1,13 ± 0,03
Rim E	1,14 ± 0,08	1,18 ± 0,06	1,15 ± 0,07	1,07 ± 0,08	1,12 ± 0,02
Testículo D	1,75 ± 0,06	1,79 ± 0,07	1,69 ± 0,06	1,71 ± 0,12	1,63 ± 0,13
Testículo E	1,75 ± 0,06	1,76 ± 0,05	1,62 ± 0,08	1,80 ± 0,10	1,64 ± 0,11
Epidídimo D	0,76 ± 0,05	0,62 ± 0,02	0,70 ± 0,04	0,58 ± 0,06*	0,59 ± 0,03*
Epidídimo E	0,74 ± 0,04	0,62 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,57 ± 0,03*	0,57 ± 0,05*
Próstata	0,81 ± 0,06	0,83 ± 0,09	0,71 ± 0,07	0,79 ± 0,14	0,66 ± 0,06
Vesícula seminal	0,67 ± 0,10	0,63 ± 0,10	0,78 ± 0,04	0,77 ± 0,09	0,65 ± 0,07

* Diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

5.2.8. Número total de espermatozóides

O Gráfico 30 mostra os valores médios do número de espermatozóides presentes na cauda do epidídimo dos animais de cada grupo, determinado a partir da contagem dos espermatozóides presentes em uma alíquota do macerado dos epidídimos na câmara de Neubauer. (GC- = 8; GC+ = 5; GI1 = 8; GI2 = 5; GI3 = 3).

Com base nos resultados, verifica-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os grupos GI3 e GC+ são diferentes estatisticamente de GC- e também dos grupos GI1 e GI2. [ANOVA: $p = 0,007$; Teste de Bonferroni].

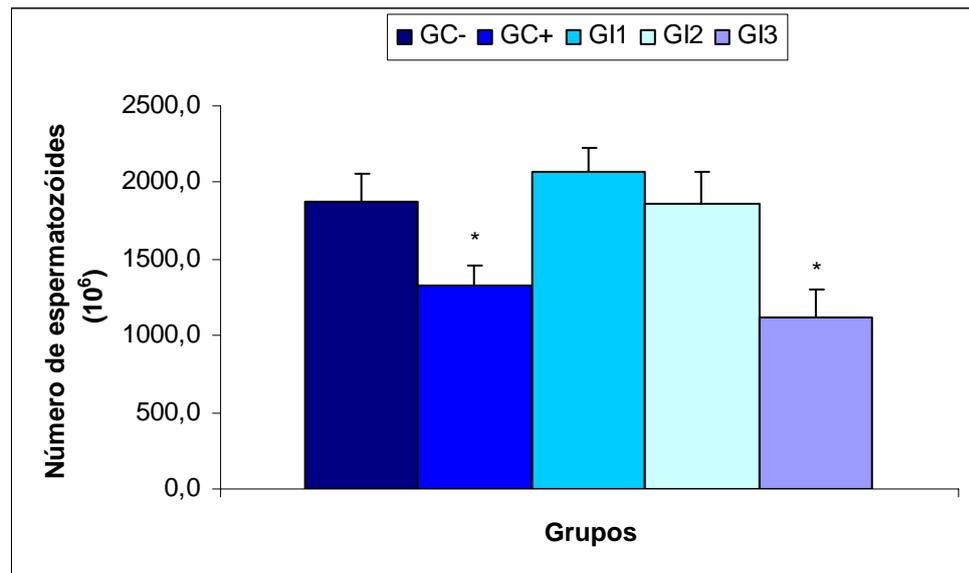


Gráfico 30. Número de espermatozoides presentes na cauda do epidídimo de ratos tratados durante 91 dias com Isoflavine® em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3 respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos grupos e as barras verticais representam o erro padrão médio (epm). * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle negativo.

5.2.9. Produção diária de espermatozoides

O Gráfico 31 mostra os valores médios da produção diária de espermatozoides, mensurada a partir da contagem de células espermáticas em câmara de Neubauer, a partir dos macerados dos testículos dos animais de cada grupo (GC- = 8, GC+ = 5, GI1 = 8 e GI2 = 5, GI3 = 3). Verificou-se que os grupos tratados com a formulação fitoterápica Isoflavine não se mostraram diferente estatisticamente do grupo controle negativo. (ANOVA p = 0,239).

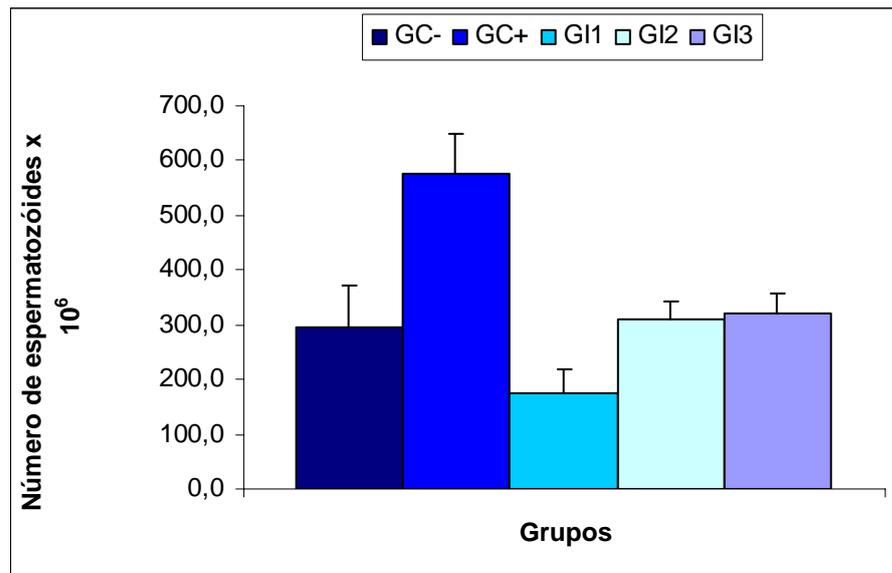


Gráfico 31. Produção diária de espermatozoides de ratos tratados durante 91 dias com o fitoterápico Isoflavine® em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3 respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos grupos e as barras verticais representam o epm.

5.2.10. Morfologia Espermática

O Gráfico 32 mostra o número médio de espermatozoides com alterações morfológicas em cada grupo, determinado a partir da avaliação dos espermatozoides provenientes do ducto deferente de todos os animais (GC- = 8, GC+ = 5, GI1 = 8 e GI2 = 5, GI3 = 3). O percentual de alterações morfológicas em cada grupo foi de 6 % para GC-, 8,8% para GC+, 12,3% para GI1, 28,6% para GI2 e 27,7% para GI3. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos [Teste Qui-quadrado: $p = 0,0001$] Verifica-se que os três grupos tratados com doses diferentes 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ e o grupo controle positivo são estatisticamente diferente do grupo controle negativo.

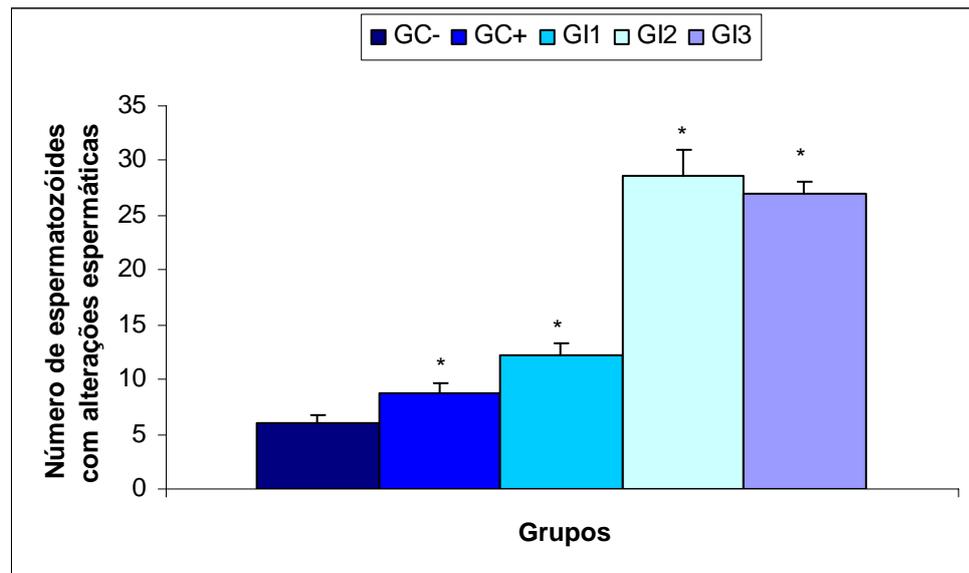


Gráfico 32. Número de espermatozoides com alterações morfológicas nos ratos tratados durante 91 dias com Isoflavine® em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3 respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos grupos e as barras verticais representam o epm. * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle negativo.

5.2.11. Desenvolvimento ponderal das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento

O Gráfico 33 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 14 dias de tratamento prévios ao acasalamento, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) das ratas tratadas por via oral com Isoflavine® (GI), em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg .kg⁻¹, (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que os grupos GC- e GC+ apresentaram um ganho relativo de massa corporal durante esse período sem diferença estatística significativa, no entanto GI1, GI2 e GI3 diferiram estatisticamente do grupo controle negativo a partir do quinto dia de tratamento [ANOVA de MR: 0,0012; Teste de Bonferroni].

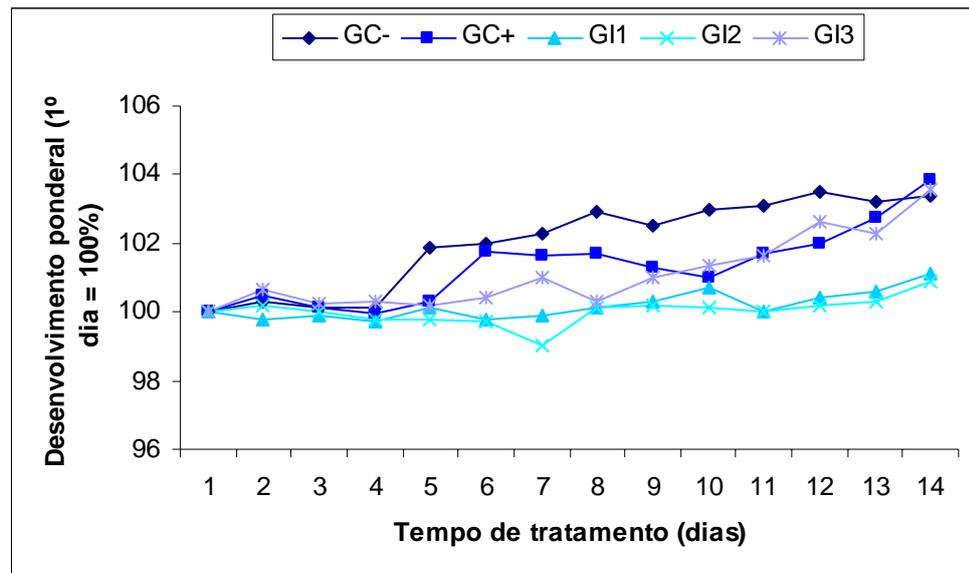


Gráfico 33. Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante a fase de pré-acasalamento com Isoflavine® em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GI1 = 24; GI2 = 15; GI3 = 8).

5.2.12. Consumo de água das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento

O Gráfico 34 mostra o consumo de água em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 14 dias de tratamento prévios ao acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Isoflavine® (GI), em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Observou-se que tanto os animais dos grupos controles negativo e positivo e os tratados com o fitoterápico, apresentaram um consumo relativo de água (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,187].

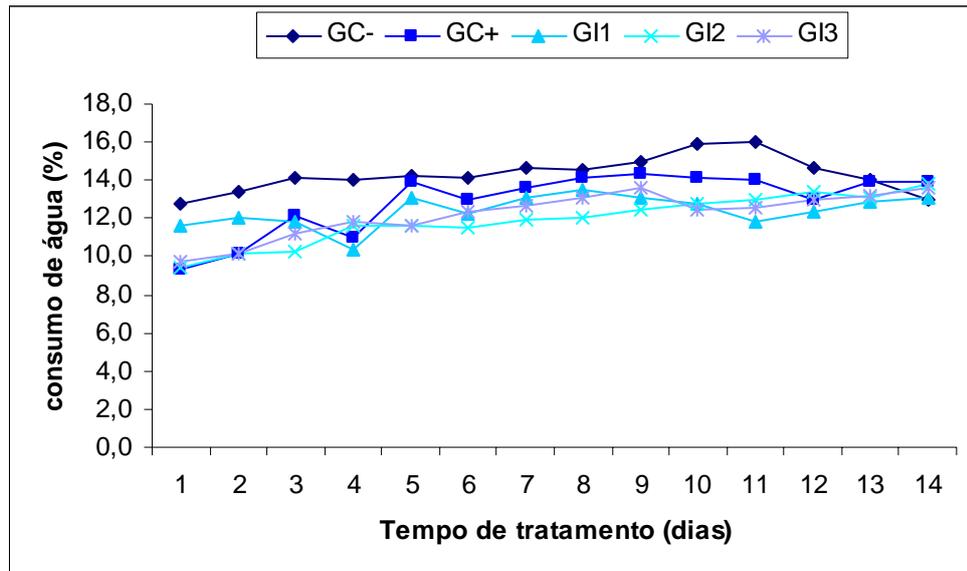


Gráfico 34. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 14 dias prévios ao acasalamento, de ratas tratadas com Isoflavine em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GI1 = 24; GI2 = 15; GI3 = 8).

5.2.13. Consumo de ração das ratas durante os 14 dias prévios ao acasalamento

O Gráfico 35 mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 14 dias prévios ao acasalamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Isoflavine® (GI) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹, (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verificou-se que tanto as ratas tratadas com o fitoterápico quanto as ratas dos grupos controles apresentaram um consumo relativo de ração (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p =0,244].

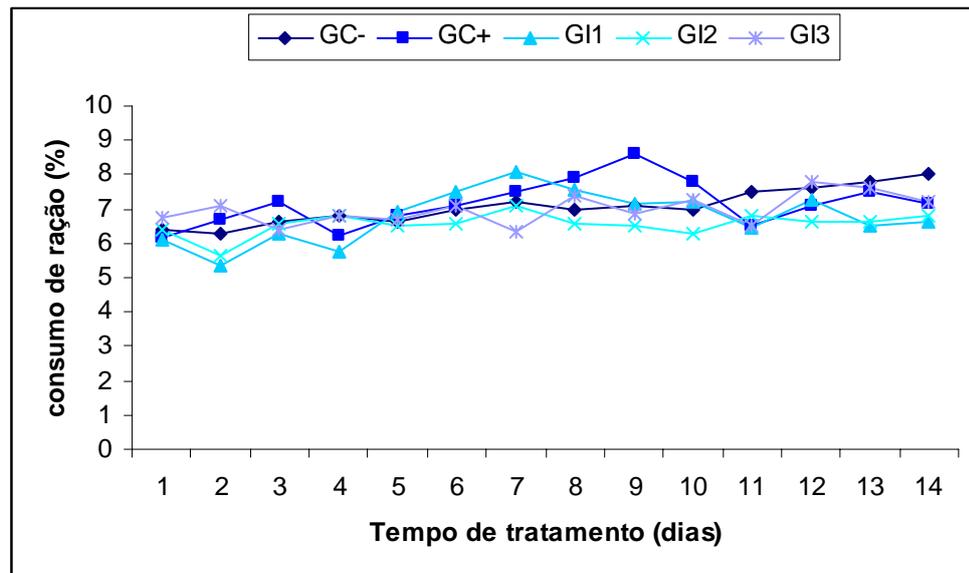


Gráfico 35. Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 14 dias prévios ao acasalamento, tratadas com Isoflavine (GI) em três doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ (GI1, GI2 e GI3, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 24; GC+ = 16; GI1 = 24; GI2 = 15; GI3 = 8).

5.2.14. Desenvolvimento ponderal das ratas durante a gestação

O Gráfico 36 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 21 dias de gestação, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) das ratas tratadas por via oral com Isoflavine® (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹, (GI1 e GI2, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que todos os grupos apresentaram um ganho relativo de massa corporal durante esse período, sem diferença estatística significativa. [ANOVA de MR: 0,506]. O ganho relativo médio dos grupos GC-, GC+ e GI1 foi de 23,5% e GI3 o ganho médio foi de 30,2%.

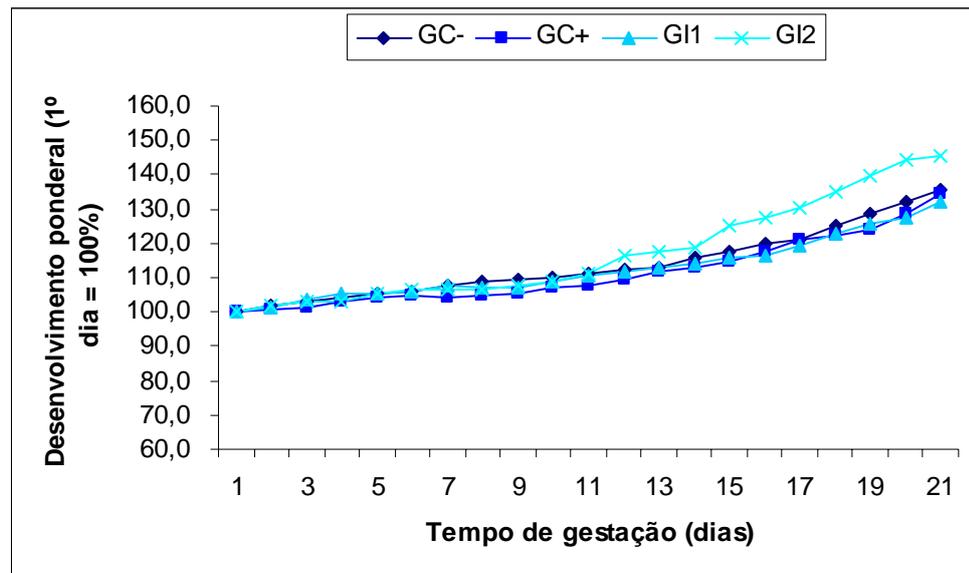


Gráfico 36. Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante a fase de gestação com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GI1 = 13; GI2 = 2).

5.2.15. Consumo de água das ratas durante a gestação

O Gráfico 37 mostra o consumo de água em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de gestação. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Isoflavine® (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹, (GI1 e GI2, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Observou-se que tanto os animais dos grupos controles e os tratados com o fitoterápico, apresentaram um consumo relativo de água (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 203].

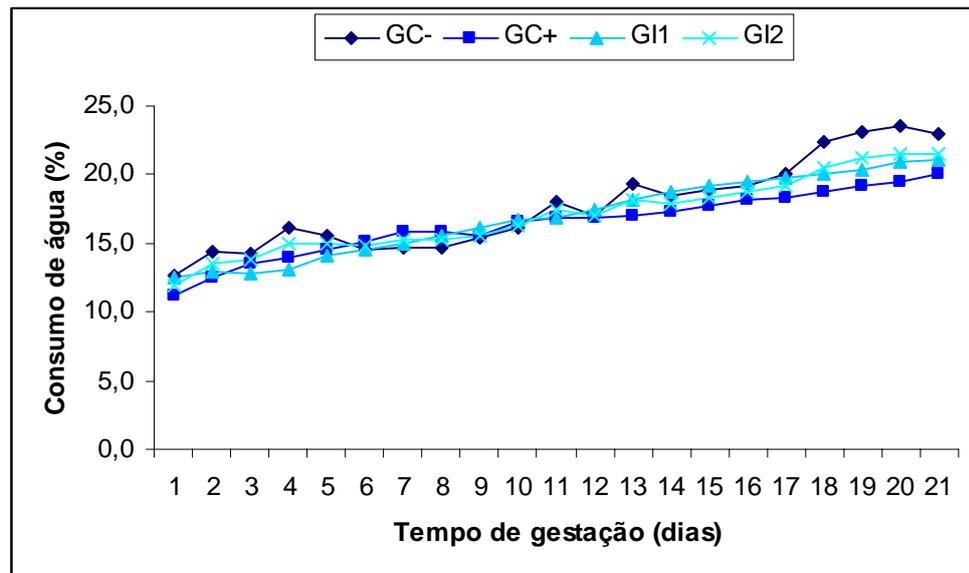


Gráfico 37. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GI1 = 13; GI2 = 2).

5.2.16. Consumo de ração das ratas durante a gestação

O Gráfico 38 mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de gestação. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Isoflavine® (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹, (GI1 e GI2, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verificou-se que tanto as ratas tratadas com o fitoterápico quanto as ratas dos grupos controles apresentaram um consumo relativo de ração (%) semelhante, representando 10,6%, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p =0,124].

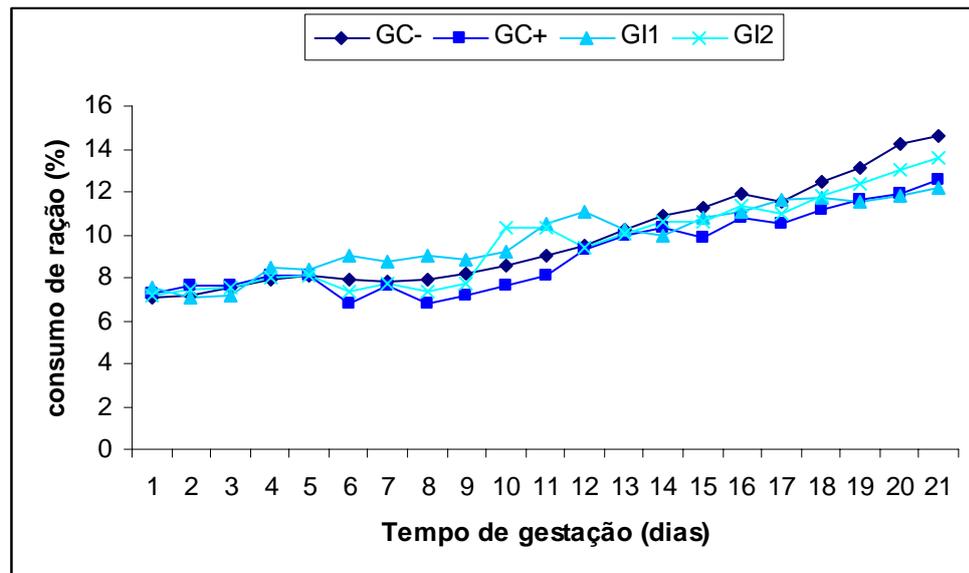


Gráfico 38. Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 13; GC+ = 2; GI1 = 13; GI2 = 2).

5.2.17. Desenvolvimento ponderal das ratas durante a lactação

O Gráfico 39 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 21 dias de lactação, calculado a partir da mensuração diária da massa corporal (g) das ratas tratadas por via oral com Isoflavine® (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹, (GI1 e GI2, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verifica-se que todos os grupos apresentaram um ganho relativo de massa corporal durante esse período sem diferença estatística significativa. [ANOVA de MR: 0,451].

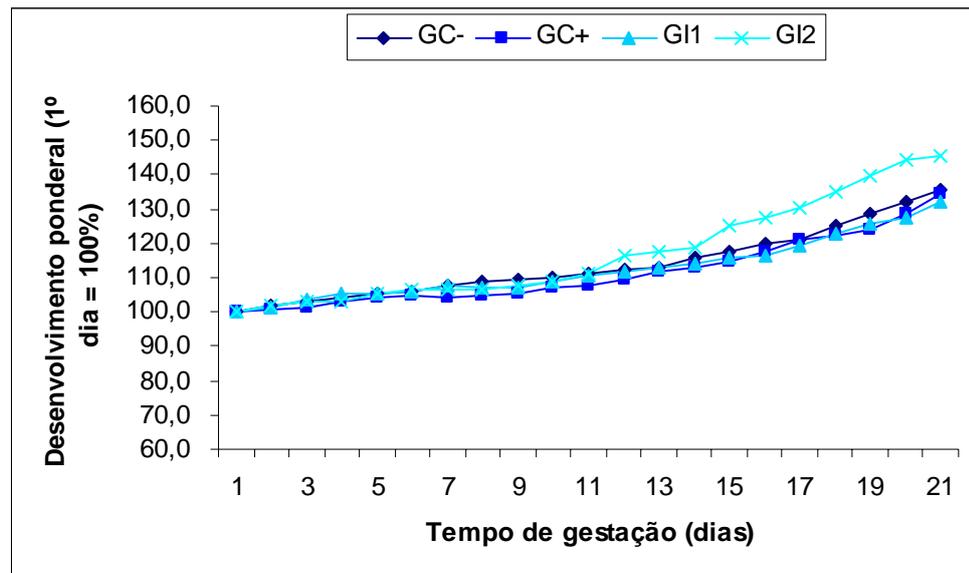


Gráfico 39. Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas durante os 21 dias de lactação com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo (GC- = 5; GC+ = 1; GI1 = 2 ; GI2 = 1).

5.2.18. Consumo de água das ratas durante a lactação

O Gráfico 40 mostra o consumo de água em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de lactação. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Isoflavine® (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹, (GI1 e GI2, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Observou-se que tanto os animais dos grupos controles e os tratados com o fitoterápico, apresentaram um consumo relativo de água (%) semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0141].

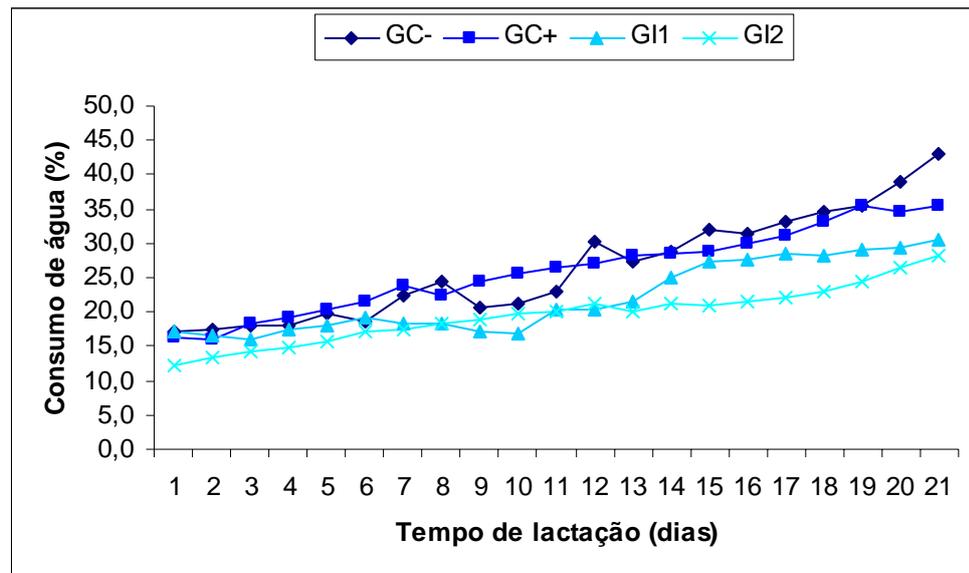


Gráfico 40. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de gestação, de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 5; GC+ = 1; GI1 = 2; GI2 = 1).

5.2.19. Consumo de ração das ratas durante a lactação

O Gráfico 41 mostra o consumo de ração em relação à massa corporal (%), avaliado durante os 21 dias de lactação. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g), de ratas tratadas por via oral com Isoflavine® (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ (GI1 e GI2, respectivamente) um grupo controle negativo (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). Verificou-se que as ratas tratadas dos Grupos GI1 e as ratas dos grupos controles apresentaram um consumo relativo de ração (%) semelhante, cerca de 22%, e apesar de GI2 apresentar um consumo relativo inferior, 12% não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. [ANOVA de MR: p = 0,098].

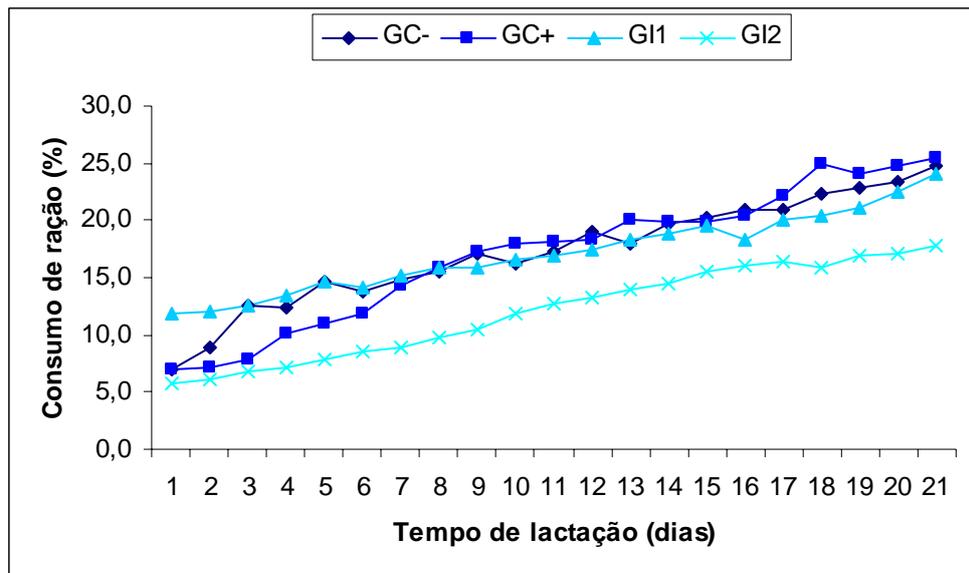


Gráfico 41. Consumo percentual de ração das ratas (%) em relação à massa corporal durante os 21 dias de lactação, tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+). Os valores representam a média dos animais por grupo. (GC- = 5; GC+ = 1; GI1 = 2; GI2 = 1).

5.2.20. Massa Relativa de órgãos das Ratas

A Tabela 7 apresenta a massa relativa dos órgãos das ratas tratadas por via oral com o fitoterápico Isoflavine® (GI) que pariram a termo, em duas doses diferentes 4,3; 21,5mg.kg⁻¹, (GI1 e GI2, respectivamente) um grupo controle (GC-) e um grupo controle positivo (GC+) durante as fases de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.

Observou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação à massa corporal dos órgãos sexuais, nem nos demais órgãos enviados para análise histopatológica. (ANOVA: $p > 0,05$).

Tabela 7. Massa relativa dos órgãos (%) das fêmeas tratadas durante as fases de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 21,5mg.kg⁻¹, um grupo controle (GC-) e um grupo controle positivo (GC+). São apresentados os valores médios e o erro padrão médio (epm) por grupo.

Órgãos	GC- (n = 7)	GC+ (n = 1)	GI1 (n = 5)	GI2 (n = 2)
Coração	0,73 ± 0,02	0,81 ± 0,04	0,74 ± 0,02	0,73 ± 0,03
Baço	0,47 ± 0,01	0,51 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,42 ± 0,02
Fígado	10,31 ± 0,33	12,23 ± 0,45	10,04 ± 0,54	9,82 ± 0,25
Rim D	0,84 ± 0,01	0,92 ± 0,03	0,85 ± 0,01	0,80 ± 0,02
Rim E	0,80 ± 0,03	0,90 ± 0,03	0,81 ± 0,02	0,79 ± 0,03
Ovário D	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Ovário E	0,07 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Útero	0,37 ± 0,11	0,38 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,43 ± 0,03

5.2.21. Índices reprodutivos dos animais tratados

A Tabela 8 apresenta os índices reprodutivos dos animais tratados (antes e durante o acasalamento e durante a gestação) com o fitoterápico Isoflavine® (GI) em três diferentes doses, 4,3; 21,5 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-). Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo nas taxas reprodutivas, na taxa de acasalamento os três grupos tratados se mostraram diferentes e na taxa de gestação o grupo controle positivo e GI3 foram diferentes de GC-. Na taxa de perdas pós-implantação, GI1 e GI2 foram diferentes do grupo controle negativo [Teste Qui-Quadrado $p < 0,01$].

Tabela 8. Índices reprodutivos de ratas tratadas com extrato do fitoterápico Isoflavine (GI). São apresentados os valores do número de observações indicados (n) e as taxas em valores percentuais.

Índices reprodutivos	GC-	GC+	GI1	GI2	GI3
Fêmeas acasaladas (n)	24	12	24	9	10
Machos acasalados (n)	8	5	8	5	5
Fêmeas com esfregaço vaginal positivo	18	5	6	2	3
Fêmeas prenhes (n)	13	1	6	2	0
Taxa de acasalamento (%)	69,2	45,5	22,2*	22*	37,5*
Taxa de gestação (%)	81,25	20*	100	100	0*
Taxa de perdas pós-implantação (%)	0	0	11,1*	8*	0

* Diferença estatística significativa ($p < 0,01$)

A Tabela 9 apresenta os índices reprodutivos das fêmeas tratadas com o fitoterápico Isoflavine® (GI) em duas diferentes doses, 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-) que pariram a termo. (Figura 7) A massa corporal (g) no nascimento bem como o número médio de filhotes

não mostrou diferença estatisticamente significativa [ANOVA $p > 0,05$]. As taxas de parto e de natalidade apresentaram diferença estatística significativa no grupo GI2, em relação ao grupo controle negativo. [Teste Qui-Quadrado $p > 0,01$].

Tabela 9. Índices reprodutivos de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em três doses: 4,3; 21,5 e 43mg .kg⁻¹ um grupo controle negativo (GC-) e um controle positivo (GC+) e que pariram à termo. São apresentados os valores médios \pm epm do número de observações indicados (n) e as taxas em valores percentuais.

Índices Reprodutivos	GC-	GC+	GI1	GI2
N (progenitoras) Filhotes	(7) 47	(1) 8	(4) 13	(1) 9
Número de filhotes/ninhada	10,2 \pm 1,6	8	5,3 \pm 1,5	9
Massa corporal dos filhotes(g)	5,6 \pm 0,14	5 \pm 0,01	5,3 \pm 0,1	6 \pm 0,3
Taxa de parto (%)	100%	100%	100%	50%*
Taxa de natalidade (%)	100%	100%	100%	55,5%*
Taxa de viabilidade (%)	100%	100%	95,5%	100%
Taxa de desmame (%)	98,4%	100%	90,9%	100%

* Diferença estatística significativa ($p < 0,01$)

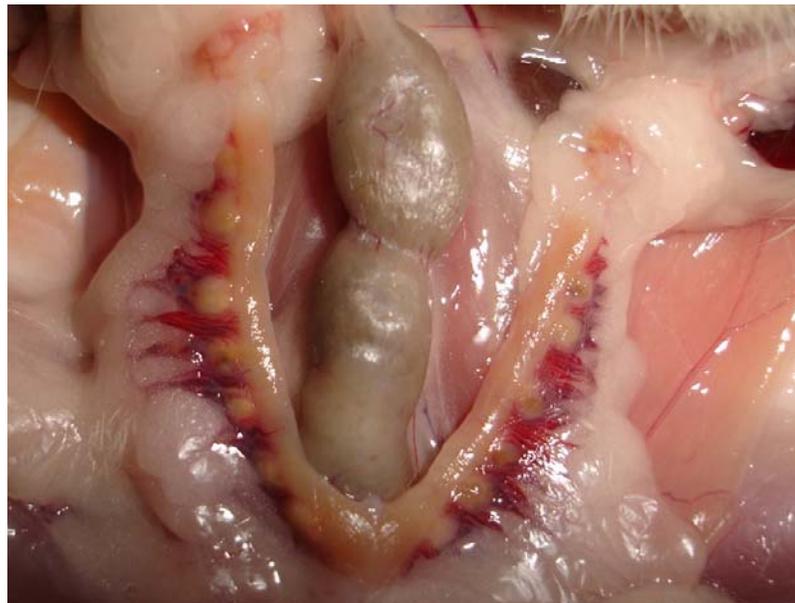


Figura 7. Útero de rata (GI2) que pariu a termo oito filhotes e apresentando 13 implantes uterinos, cinco a mais do que os filhotes nascidos.

A Tabela 10 apresenta os índices de fertilidade das fêmeas tratadas com o fitoterápico Isoflavine (GI) na dose terapêutica 4,3 mg.kg⁻¹, comparada a um grupo controle negativo (GC-) que sofreram cesariana no 21º dia de gestação (Figura 8). A massa corporal (g) dos fetos no momento da cesariana e a massa do útero gravídico (g) não mostraram diferença estatisticamente significativa [ANOVA: $p = 0,152$]. O número

médio de filhotes apresentou diferença estatística significativa, em relação ao grupo controle [ANOVA: $p = 0,0021$].

Tabela 10. Índices reprodutivos de ratas tratadas com Isoflavine® (GI) na dose $4,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ comparada a um grupo controle negativo (GC-) e que sofreram cesariana no 21º dia de gestação. São apresentados os valores médios \pm epm do número de observações indicados (n).

Índices reprodutivos	GC-	GI1
N (progenitoras) Filhotes	(5) 61	(2) 17*
Massa do útero grávido (g)	$68,35 \pm 8,0$	$64,21 \pm 3,6$
Número de fetos/ninhada	$10,2 \pm 1,6$	$10,2 \pm 0,8$
Massa corporal dos fetos (g)	$4,8 \pm 0,1$	$5,17 \pm 0,6$
Alterações macroscópicas externas nos fetos	-	-

* Diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

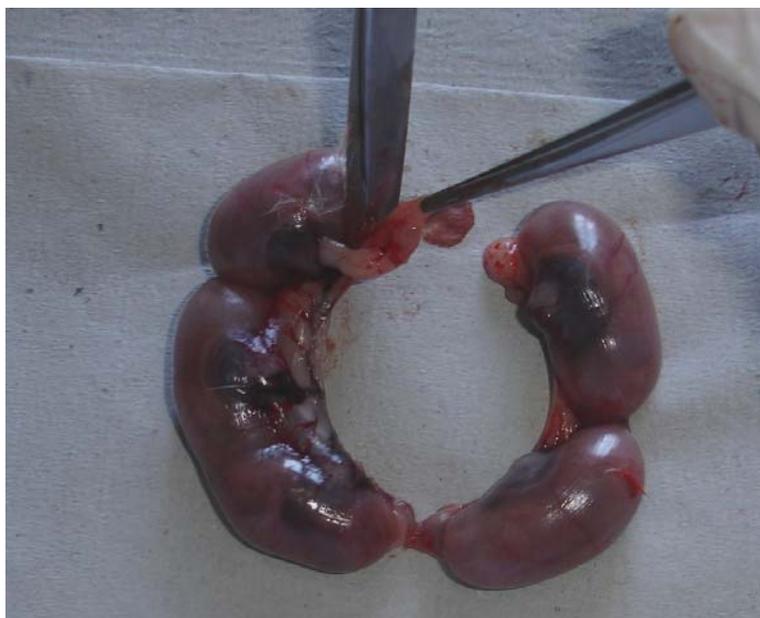


Figura 8. Procedimento da cesariana, retirada dos fetos dos envoltórios fetais.

5.2.22. Desenvolvimento ponderal das progênes

O Gráfico 42 mostra o desenvolvimento ponderal (g) das progênes de ratas tratadas com o fitoterápico Isoflavine® durante o período prévio ao acasalamento, acasalamento, gestação e lactação (Figura 9).

Verificou-se que não houve diferença estatística entre os grupos. [ANOVA de MR: $p = 0,095$].

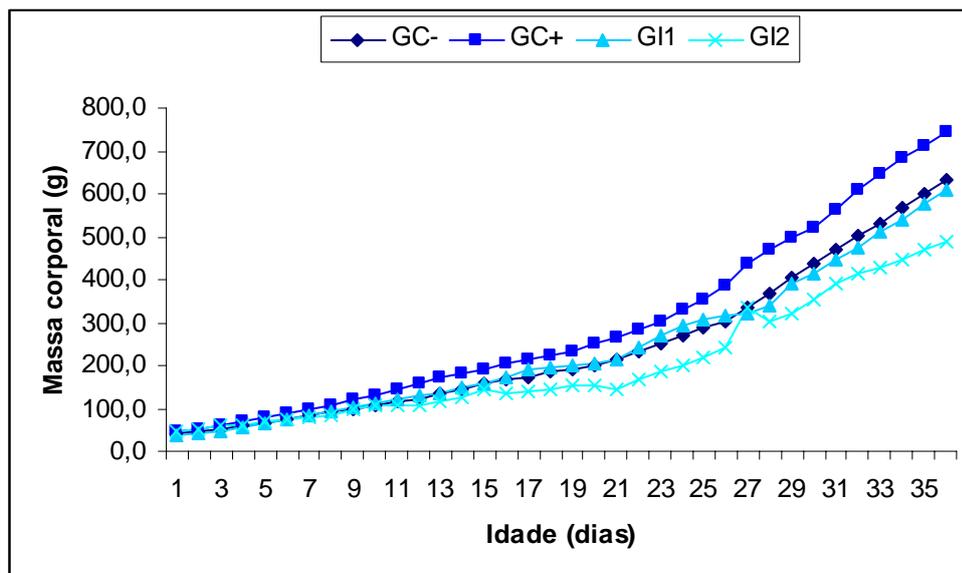


Gráfico 42. Desenvolvimento ponderal (g) das progêneses desde o nascimento até o 36º dia, nascidos de ratas tratadas com Isoflavine (GS) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos.

O Gráfico 43 mostra o desenvolvimento ponderal (g) individual das progêneses de ratas tratadas com o fitoterápico Isoflavine® durante o período prévio ao acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.

Verificou-se que os filhotes de todos os grupos apresentaram um desenvolvimento ponderal semelhante, não havendo diferença estatisticamente significativa. [ANOVA de MR p = 0,414].



Figura 9. Pesagem da ninhada, realizada diariamente.

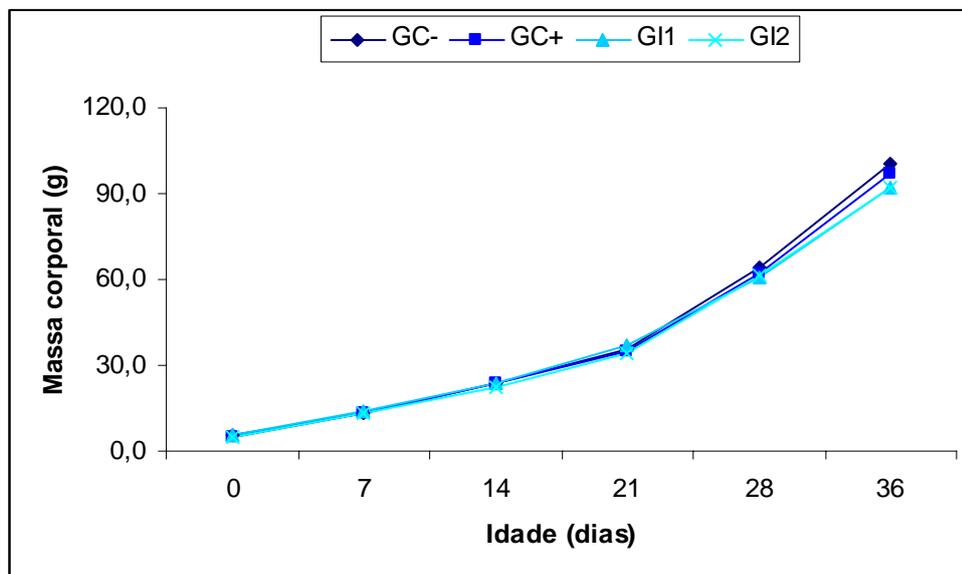


Gráfico 43. Desenvolvimento ponderal (g) individual das progênies desde o nascimento até o 36º dia, nascidos de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação. Os valores representam a média dos grupos.

5.2.23. Características de desenvolvimento das progênies

O Gráfico 44 e o Gráfico 45 mostram a idade (dias de vida) no surgimento das características de desenvolvimento geral e sexual, respectivamente, nos filhotes nascidos de ratas tratadas com o fitoterápico Isoflavine® em duas doses diferentes, um grupo controle positivo e um grupo controle negativo. Ambas as características de desenvolvimento se manifestaram em períodos correspondentes aos do grupo controle negativo.

O Gráfico 44 apresenta a idade (dias de vida) dos filhotes no aparecimento das características de desenvolvimento geral. O Gráfico 44A mostra descolamento dos pavilhões auriculares surgiu no mesmo período em todos os grupos experimentais, entre o primeiro e o terceiro dia de vida. [Teste Qui-Quadrado $p = 1$]. O Gráfico 44B mostra o surgimento da penugem, que ocorreu entre o terceiro o sexto dia de vida em todos os grupos [Teste Qui-Quadrado $p = 1$]. A erupção dos dentes incisivos é representada no Gráfico 44C, ocorreu entre o sexto e o oitavo dia, o surgimento do pelo se deu entre o sétimo e oitavo dia como mostra o Gráfico 44D [Teste Qui-Quadrado $p = 1$]. A abertura

dos olhos mostrada no Gráfico 44E ocorreu entre os dias 11° e 15° [Teste Qui-Quadrado $p = 1,1$].

Nenhuma das variáveis das características de desenvolvimento geral e sexual apresentaram diferença estatisticamente significativa.

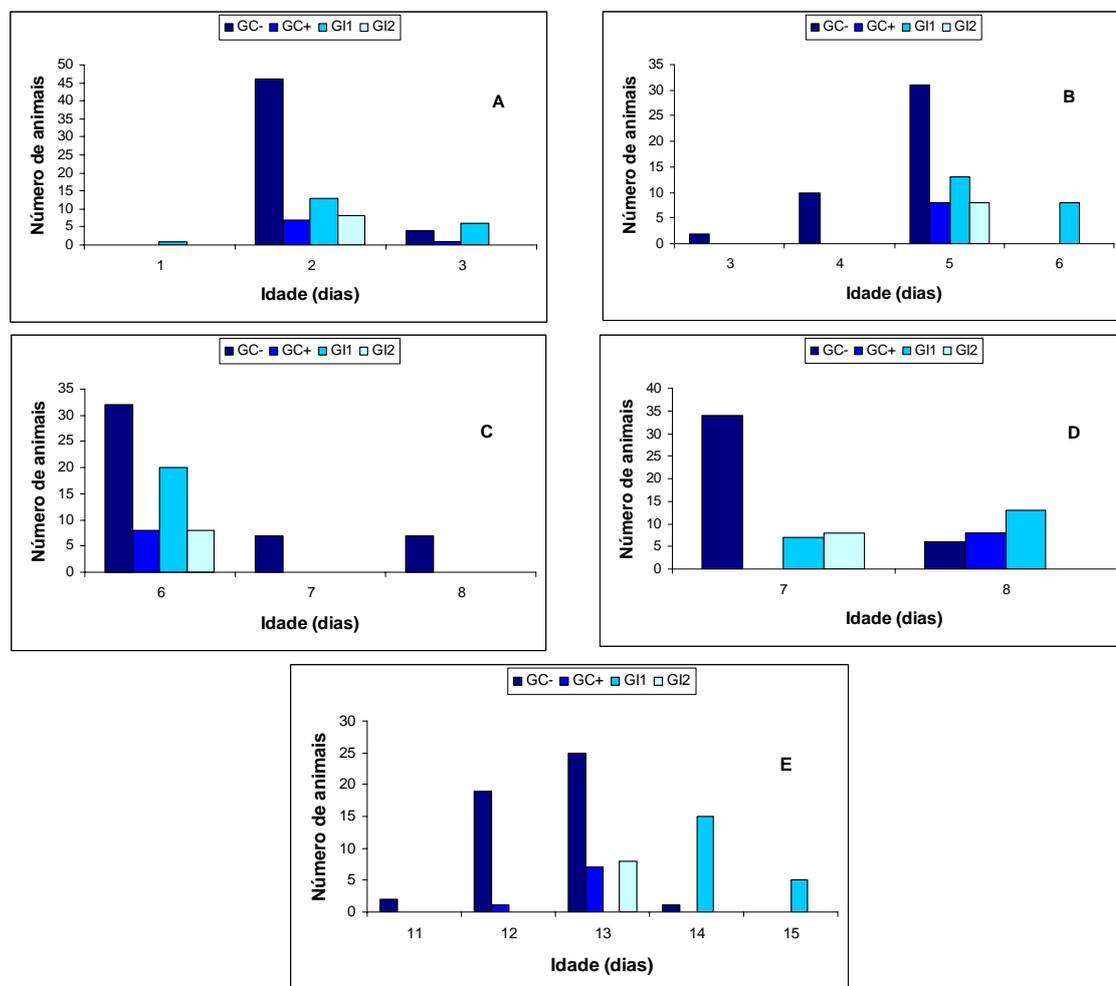


Gráfico 44. Idade em dias do aparecimento das características de desenvolvimento geral das progênes de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.

O Gráfico 45 mostra a idade (dias de vida) dos filhotes no aparecimento das características de desenvolvimento sexual (descida dos testículos, separação prepucial e abertura do canal vaginal). A descida dos testículos representada no Gráfico 45A ocorreu entre o 15° e 18° dia de vida em todos os grupos experimentais. [Teste Qui-Quadrado $p = 1$]. No Gráfico 45B está representada a separação prepucial, que ocorreu entre o 34° e o 37° dia de vida [Teste Qui-Quadrado $p = 1$]. A abertura do canal vaginal, (Figura 10) expressa no Gráfico 45C, ocorreu entre o 30° e 35° dia de vida. [Teste Qui-Quadrado $p = 1,2$].

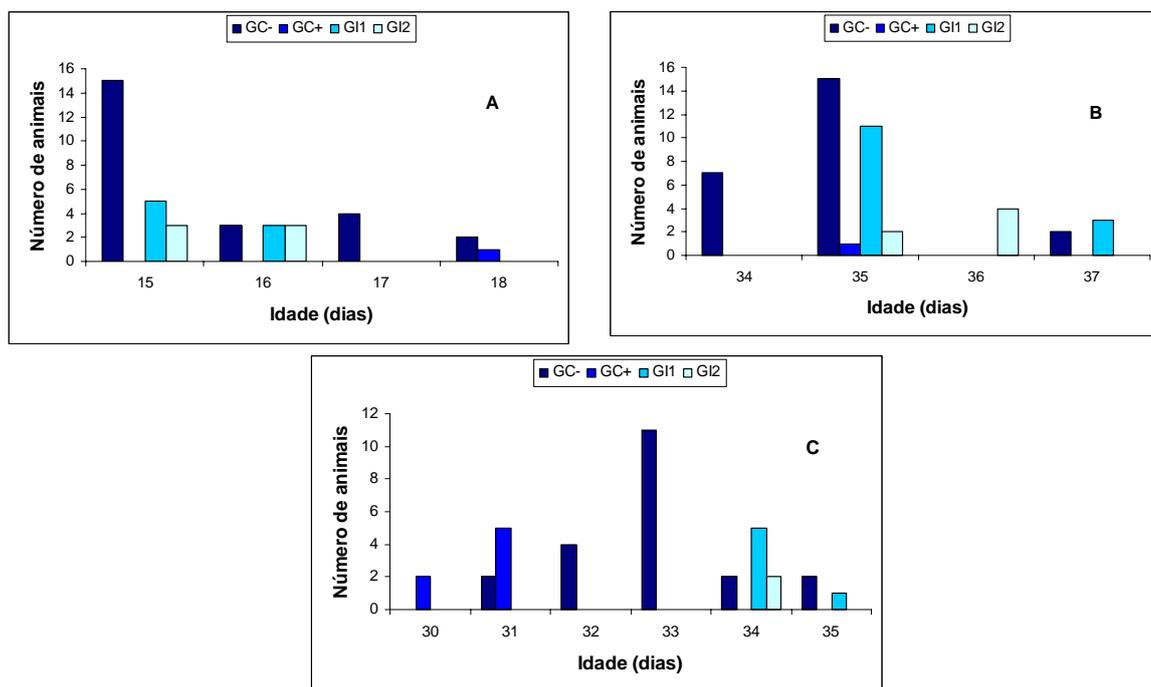


Gráfico 45. Idade em dias do aparecimento das características de desenvolvimento sexual das progênies de ratas tratadas com Isoflavine (GI) em duas doses: 4,3 e 43mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação.

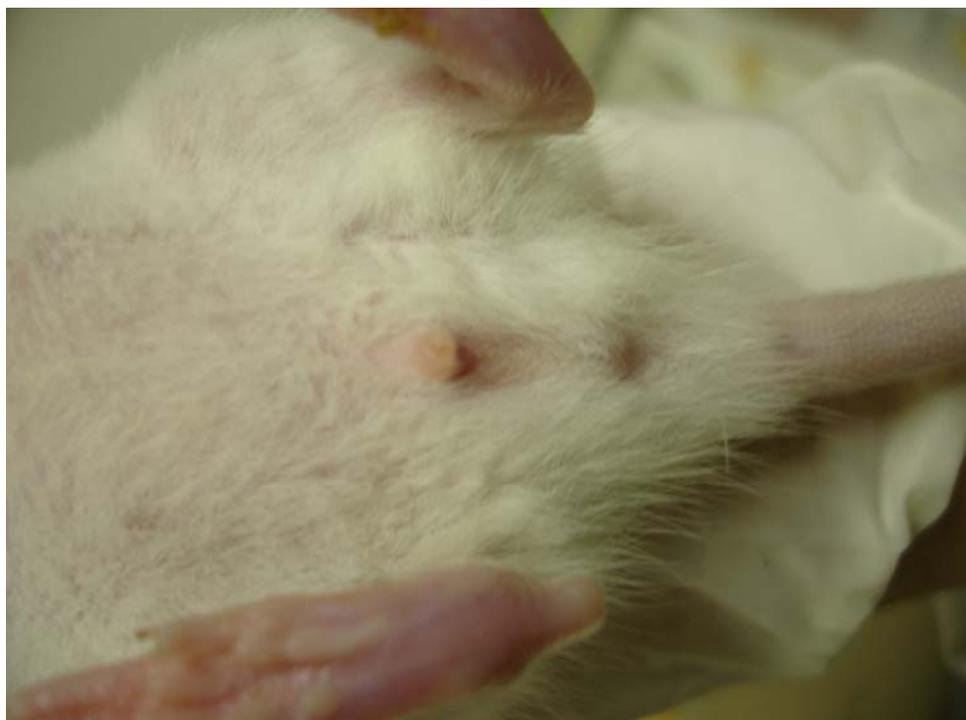


Figura 10. Canal vaginal fechado de rata do grupo controle positivo, no 33º dia de vida.

5.2.24. Registro de comportamento em campo aberto

O Gráfico 46 representa o registro de comportamento em campo aberto dos filhotes de ratas tratadas com o fitoterápico Isoflavine® (GI) em duas doses: 4,3 e 21,5mg.kg⁻¹ e um controle positivo (GC+) comparados a um grupo controle negativo (GC-), aos 75 dias de vida.

Em relação ao número de entradas no centro do campo aberto não houve diferença estatisticamente significativa, todos os grupos testados entraram e permaneceram no centro da caixa de campo aberto [ANOVA p = 0,243]. O gráfico também apresenta a frequência de locomoção total no campo aberto, os grupos não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si [ANOVA p = 0,254]. A frequência do comportamento de “rearing”, expressada no gráfico, não foi estatisticamente diferente entre os grupos [ANOVA p = 0,311]. O Gráfico 46 também mostra o comportamento de “escanear”. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos testados [ANOVA p = 0,115].

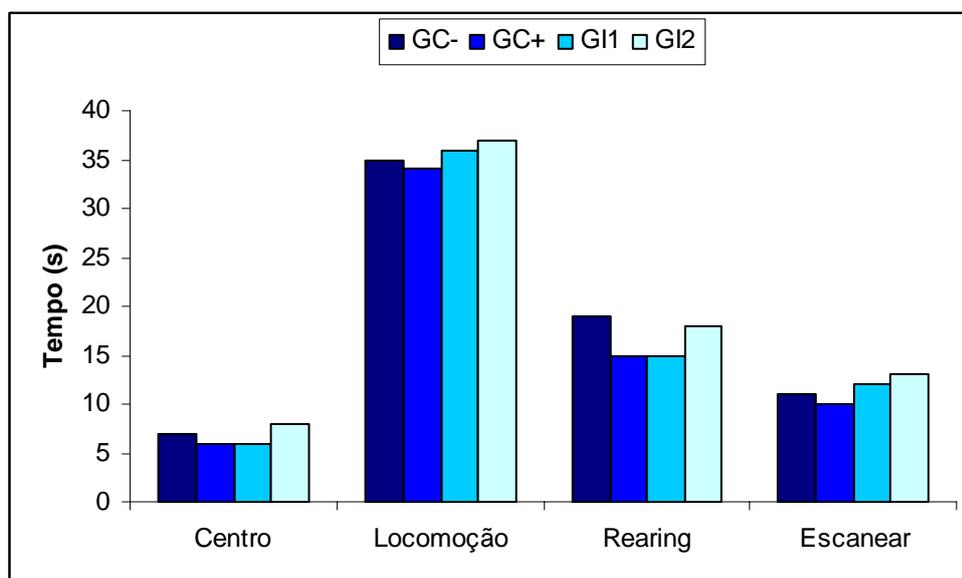


Gráfico 46. Frequência de entrada no centro do campo aberto, tempo de locomoção total dentro da caixa, comportamento de “rearing” e comportamento de “escanear”. Cada animal foi analisado durante 5 minutos. (GC- n = 2; GC+ n = 2; GI1 n = 2; GI2 n = 2).

5.3. Análise histopatológica

Os órgãos dos animais que completaram o experimento, machos no final do acasalamento e fêmeas no final da lactação, foram enviados para análise histológica ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS. Todos os

cortes histológicos dos grupos tratados foram comparados aos cortes de órgãos do grupo controle negativo.

Os animais do grupo controle negativo, positivo e dos grupos tratados diariamente por via oral, com os fitoterápicos Soyfemme® e Isoflavine® em diferentes doses, 4,3; 21,5 e 43mg/kg⁻¹ não apresentaram nenhum tipo de lesão histológica no parênquima dos órgãos sexuais e nem nos demais órgãos enviados para análise. As figuras que seguem mostram tecidos de órgãos de machos e fêmeas sem alterações histopatológicas (Figura 11, Figura 12, Figura 13 e Figura 14).



Figura 11. Testículo de animal do grupo GS2, túbulos seminíferos em diferentes estágios de epitélio, sem alterações histológicas (Objetiva 10).

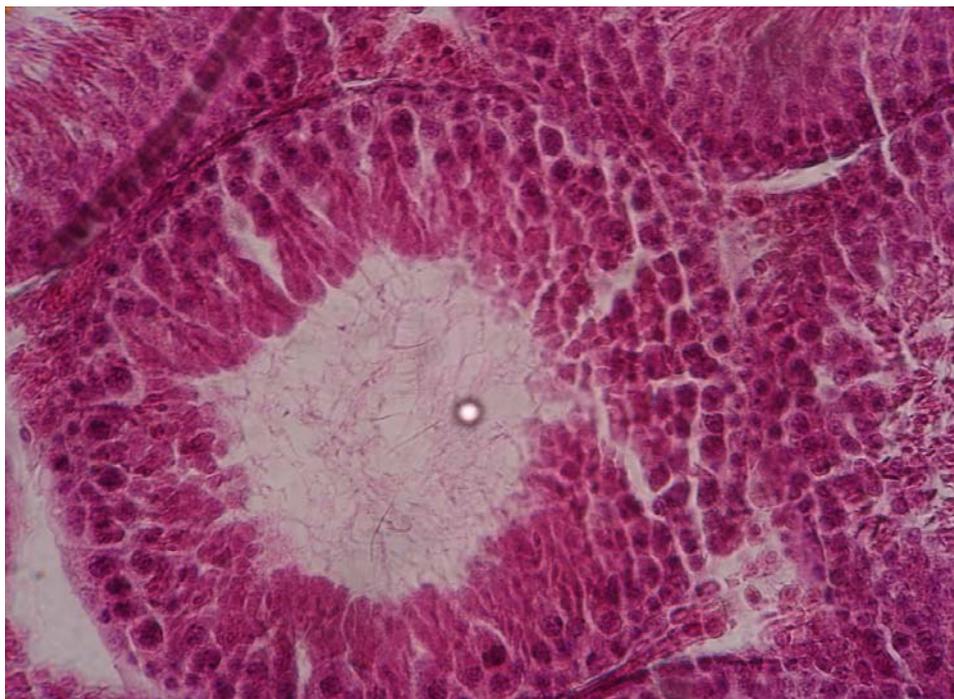


Figura 12. Testículo de animal do grupo GI3, presença de espermatozoides na luz do túbulo seminífero, sem alterações histológicas (Objetiva 40).

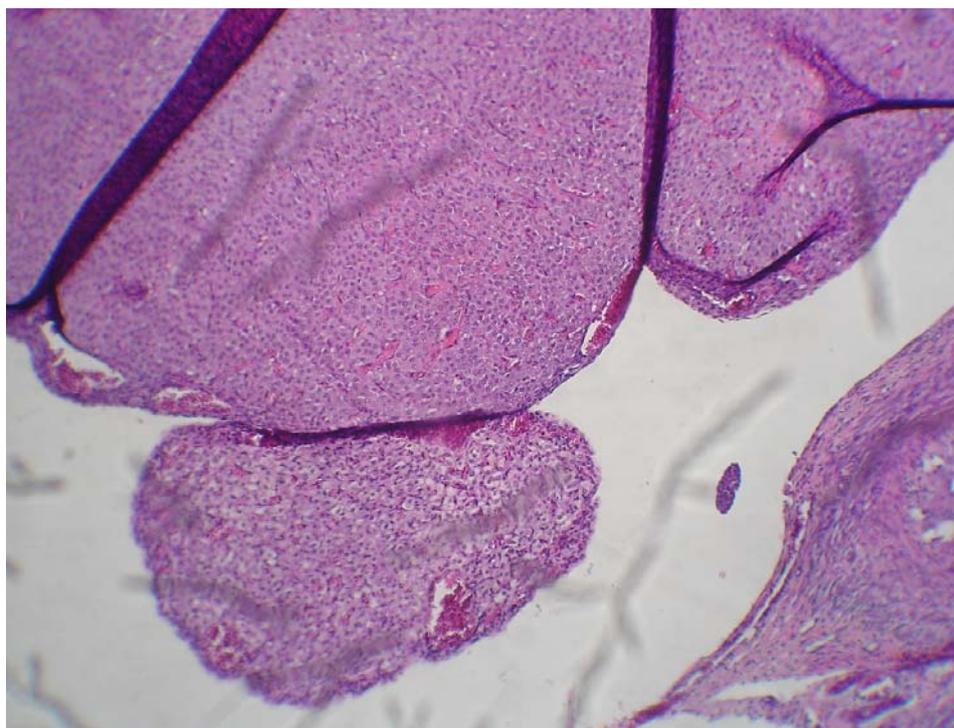


Figura 13. Ovário com corpo lúteo de fêmea do grupo GS2 (objetiva 10).

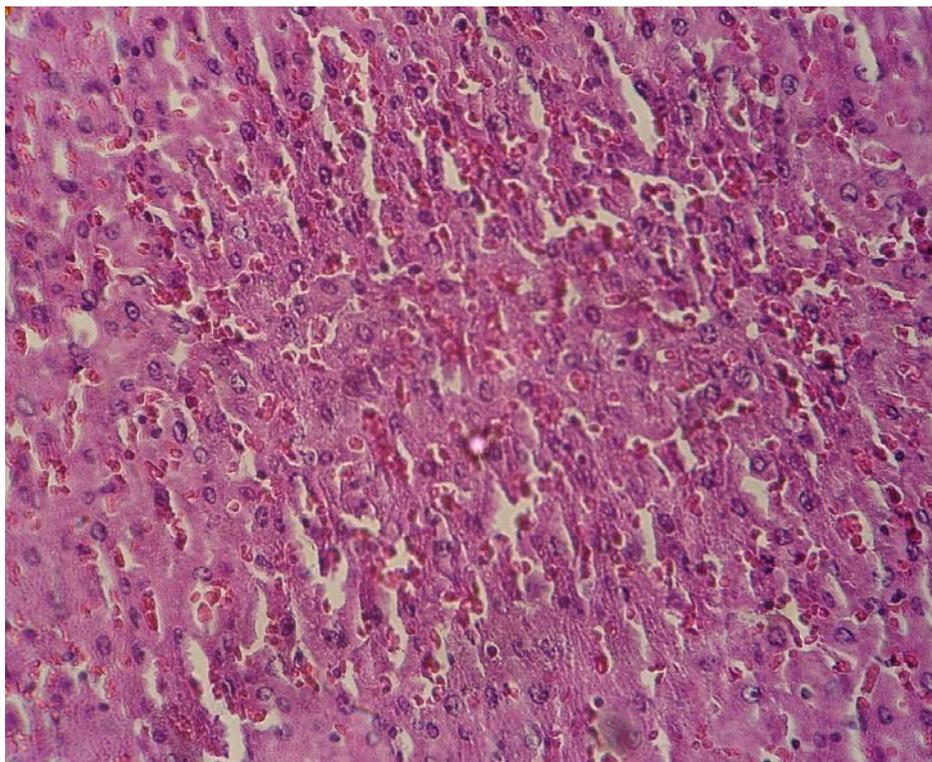


Figura 14. Fígado de fêmea do grupo G13, sem alteração histológica (objetiva 40).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho apontou que as três doses das formulações fitoterápicas Soyfemme® e Isoflavine® que contém soja [*Glycine max* (L.) Merr] administradas diariamente por via oral a ratos Wistar, durante os períodos de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação interferiram nas variáveis reprodutivas avaliadas em machos e fêmeas.

Os testes de toxicidade reprodutiva são realizados para definir os efeitos diretos de uma substância química no organismo de mamíferos e devido à complexidade dos processos reprodutivos que envolvem a fertilidade e desenvolvimento pré e pós-natal, é inevitável afirmar que a exposição a agentes químicos possa exercer efeitos prejudiciais sobre esses processos reprodutivos.

Em relação às mamas, Wood et al. (2006) constataram que as isoflavonas propiciam efeitos antiestrogênicos, enquanto outros autores observaram ação oposta; no endométrio, Unfer et al. (2004) notaram maiores riscos de hiperplasia em usuárias que fizeram uso prolongado. Por isso, muitos admitem que as isoflavonas exerçam sua ação como um modulador seletivo de receptores de estrogênio. A mesma controvérsia tem sido apontada para os efeitos das isoflavonas sobre a função cognitiva, ossos e perfil lipídico em mulheres após a menopausa (FERNANDES et al. 2006).

Assim, frente a esse impasse e, como as evidências sobre a prescrição de isoflavonas carecem de estudos com adequado grau de recomendação, a *American Heart Association (AHA)* publicou em 2006 um aconselhamento visando esclarecer as repercussões das isoflavonas de soja, não só para a saúde cardiovascular, mas também para outros efeitos clínicos, a partir da avaliação de 19 estudos randomizados, dando destaque para os seguintes resultados: o impacto foi nulo para o colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicerídeos, lipoproteína e pressão arterial; não se observou melhora dos sintomas vasomotores da menopausa; os resultados foram controversos no tocante à perda da massa óssea após a menopausa; a eficácia e segurança na prevenção ou tratamento dos cânceres de mama e de endométrio ainda não estão estabelecidas (FERNANDES et al. 2006).

Contudo, a investigação de fitoestrógenos desde 1940 tem considerado possíveis efeitos nocivos, através da descoberta de que os animais que pastavam nas plantas ricas em fitoestrogênios tinham seus fetos abortados (McVAY et al. 2004). Animais machos também podem ser sensíveis aos efeitos da isoflavona uma vez que a genisteína pode inibir o crescimento e a proliferação de linhagens celulares do testículo (KUMI-DAIKA et al., 1998), e, em ratos, Delclos et al. (2001) demonstraram que a genisteína pode perturbar a espermatogênese e diminuir o número de espermatozóides presentes no epidídimo.

A evidência de estudos em animais sugere que a ingestão de quantidades muito altas de fitoestrógenos pode afetar a fertilidade. Ovelhas e codornas expostas a níveis altos de trevo em suas forragens apresentaram infertilidade (ADAMS, 1995). Ratas alimentadas com dietas ricas em fitoestrógenos mantiveram um estado de anovulação crônico (SMOLINSKE, 1999).

Outras leguminosas, até mesmo as usadas como forrageiras para herbívoros, como *Trifolium* (gênero que inclui várias espécies de trevos) e *Medicago* (alfafa) são particularmente ricas em isoflavonas podendo, em consequência, afetar a reprodução destes animais (PINTO-LEON, 1984).

Nos bovinos uma prolongada exposição a pastos estrogênicos pode conduzir a que a infertilidade seja permanente. No gado os fitoestrógenos causam estros irregulares, ninfomania, anestros e cistos ovarianos, sem que sejam registrados casos clínicos de infertilidade (ADAMS, 1995).

6.1. Exposição dos machos na fase de gametogênese

Gametogênese é o processo pelo qual os gametas são produzidos nos organismos dotados de reprodução sexuada. Os espermatozóides e os óvulos têm origem nas células germinativas primordiais (CGPs) do embrião. Nos machos, as CGPs transformam-se em espermatogônias diplóides, que graças às fases de multiplicação, crescimento, maturação e diferenciação (ou espermiogênese), vão dar origem aos espermatozóides haplóides que vão se acumulando no lúmen dos tubos seminíferos (BOSCHILIA, 2003).

Na realização dos testes de toxicologia reprodutiva preconizados pela OECD, FDA e EPA para avaliar o desempenho reprodutivo dos machos frente à

exposição aos fitoterápicos Soyfemme® e Isoflavine®, foi necessário expor os animais durante um ciclo espermático completo.

O acompanhamento do peso corporal durante todo o tratamento fornece um índice geral do estado de saúde dos animais, e essa informação pode ser importante para a interpretação dos efeitos reprodutivos (EPA, 1996a). Diminuição no peso corporal ou a redução no ganho de peso pode refletir uma variedade de respostas, incluindo a recusa de produtos químicos que contidos na água ou comida causam redução da palatabilidade, anorexia, ou toxicidade sistêmica. Reduções graves no peso corporal adulto, induzida pela restrição da nutrição têm mostrado pouco efeito sobre os órgãos reprodutores masculinos ou na função reprodutiva masculina (CHAPIN et al., 1993a).

Nas fases pré-acasalamento e acasalamento os machos tratados com as duas formulações fitoterápicas e os machos dos grupos controle negativo e positivo não apresentaram diferenças estatísticas no desenvolvimento ponderal, todos os grupos apresentaram um ganho de massa corporal semelhante no final do tratamento.

A avaliação de dados relativos aos pesos absolutos dos órgãos é importante, pois uma diminuição de peso de um órgão reprodutivo pode ocorrer sem que esteja necessariamente relacionada com a redução no ganho de peso corporal. O peso do órgão e o peso corporal podem não mostrar nenhuma diferença significativa, encobrendo o potencial peso órgão/efeito (OECD, 1998).

Os pesos de órgãos reprodutivos masculinos que podem ser úteis para a avaliação dos riscos reprodutivos incluem os testículos, epidídimos, hipófise, vesículas seminais e próstata (EPA, 1996a).

Os animais machos tratados com Soyfemme® nas doses 21,5mg.kg⁻¹(GS2) e 43mg.kg⁻¹(GS3) tiveram redução no peso absoluto dos seguintes órgãos: fígado, epidídimos direito e esquerdo e vesícula seminal. Os animais tratados com Isoflavine® nas doses 21,5mg.kg⁻¹ (GI2) e 43mg.kg⁻¹ (GI3) tiveram redução no peso de epidídimos esquerdos e direitos.

O peso normal do testículo varia apenas modestamente dentro de um determinado número de espécies (BLAZAK et al., 1985). Esta variabilidade relativamente baixa entre os animais sugere que o peso absoluto do testículo é um indicador preciso da lesão gonadal. Entretanto, os danos aos testículos podem ser detectados apenas em doses mais elevadas do que as exigidas para produzir efeitos

significativos nas outras medidas do estado gonadal (FOOTE et al., 1986; KU et al., 1993).

Os pesos da próstata e vesícula seminal são andrógeno-dependentes e podem refletir as mudanças no estado endócrino ou função testicular do animal (EPA, 1996a).

Avaliações histopatológicas de tecidos animais têm um papel proeminente na avaliação do risco nos machos reprodutores. Os órgãos que muitas vezes são avaliados incluem os testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal e hipófise. (EPA, 1996a).

Todos os animais machos tratados com Soyfemme® e Isoflavine® e dos grupos controles, não apresentaram nenhum tipo de lesão histopatológica.

Em um estudo recente, Cardoso et al. (2007) testaram os efeitos do tratamento crônico com isoflavonas sobre a saúde reprodutiva de coelhos machos, após a exposição das fêmeas durante gestação e lactação e a prole durante 33 semanas de vida, observaram que a avaliação histopatológica não revelou qualquer alteração nos testículos, epidídimos, e nas glândulas próstata e pré-próstata dos animais. A exposição crônica também não causou alterações estatisticamente significativas na idade da puberdade, volume de sêmem, emissão diária de espermatozóides, concentração espermática, motilidade, vigor e morfologia espermática.

Faqi et al. (2004) concluíram que a administração de dieta crônica de isoflavonas da soja (PTI G-2535) não teve qualquer efeito sobre o peso absoluto ou peso relativo (em comparação com o peso corporal), do epidídimo ou testículo de ratos Wistar. Do mesmo modo, avaliação histopatológica desses tecidos falhou em identificar qualquer padrão de alterações morfológicas associado com exposição à isoflavonas. A exposição à dieta crônica de Faqi, também não teve efeito na espermatogênese em ratos expostos. Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre controles e grupos expostos à dieta de isoflavonas foram observadas em número de célula espermáticas ou a produção diária de espermatozóides, bem como a percentagem de espermatozóides morfológicamente anormais foram comparáveis em todos os grupos experimentais.

Os parâmetros que são importantes para avaliações de espermatozóides são números de espermatozóides, morfologia e mobilidade espermática. Os dados sobre os parâmetros adequados permitem uma estimativa do número de espermatozóides

"normais", um parâmetro que é susceptível de ser mais informativo do que o número de espermatozóides sozinho. Embora efeitos sobre a produção de espermatozóides possam ser refletidos em outras medidas, como contagem de células espermáticas ou peso da cauda do epidídimo, não há medidas substitutas suficientes para refletir os efeitos da morfologia ou mobilidade espermática. Dados semelhantes podem ser obtidos a partir de ejaculados não-invasíveis de humanos, reforçando a capacidade de confirmar efeitos observados em espécies - teste para detectar efeitos no homem (EPA, 1996a).

O número de espermatozóides ejaculados em qualquer espécie é influenciado por diversas variáveis, incluindo o comprimento da abstinência e da capacidade de obter toda a ejaculação. Variações intra e inter-individuais são freqüentemente elevadas, mas são pouco reduzidas se os ejaculados foram coletados em intervalos regulares a partir do mesmo macho (WILLIAMS et al., 1990). Avaliações de espermatozóides epididimais com espécies-teste, normalmente utilizam espermatozóides apenas da porção da cauda epidídimo, mas as amostras de morfologia espermática podem ser obtidas também a partir do ducto deferente. Esta avaliação tem sido habitual para expressar o espermatozóide em relação ao peso da cauda do epidídimo. No entanto, devido à contagem de espermatozóides contribuírem para o peso do epidídimo, a expressão dos dados pode realmente mascarar diminuição do número de espermatozóides. A inclusão de dados sobre a contagem absoluta de espermatozóides pode melhorar a resolução. Tal como acontecem em relação à contagem de espermatozóides, contagens de células espermáticas são influenciadas diretamente pelo nível de atividade sexual (AMANN, 1981; HURTT & ZENICK, 1986).

Vários autores sugerem que diferentes doses de exposição de fitoestrógenos dietéticos têm falhado para induzir grandes efeitos nas contagens de espermatozóides em ratos (ROBERTS et al., 2000; SHIBAYAMA et al., 2001; FIELDEN et al., 2003; FAQI et al., 2004; JUNG et al., 2004; LEE et al., 2004).

A morfologia espermática refere-se a aspectos estruturais dos espermatozóides e pode ser avaliada na cauda epidídimo, ducto deferente, ou amostras de ejaculados. Uma profunda avaliação morfológica identifica anormalidades no flagelo e cabeça do espermatozóide. Devido à sugerida correlação entre um agente da mutagenicidade e sua capacidade de induzir espermatozóides anormais, a morfologia da cabeça do espermatozóide tem sido freqüentemente relatada como a variável espermática em estudos toxicológicos sobre espécies-teste (WYROBEK et al., 1983). A

tendência tem sido concluir que o aumento da incidência de malformações na cabeça do espermatozóide reflete mutagenicidade de células germinais. Um aumento anormal na morfologia espermática foi considerado prova de que o agente tenha ganhado acesso a células germinativas (EPA, 1986).

Sugere-se neste trabalho, que as formulações fitoterápicas Soyfemme® e Isoflavine® nas diferentes dosagens utilizadas e também o grupo controle positivo, tenha atuado diretamente no epidídimo dos animais tratados, diminuindo o tamanho do órgão, aumentando o aparecimento de alterações morfológicas nos espermatozóides e reduzindo o número total de espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo. Situação que configura toxicidade espermática.

Os animais tratados com Soyfemme® e Isoflavine® nas doses $4,3\text{mg.kg}^{-1}$ (GS1 e GI1), $21,5\text{mg.kg}^{-1}$ (GS2 e GI2) e 43mg.kg^{-1} (GS3 e GI3) apresentaram um aumento de espermatozóides morfológicamente anormais de forma dose-dependente. O percentual de alterações morfológica foi: GC- = 6%; GC+ = 8,8%; GS1 =13,3%; GS2 = 19,7%; GS3 = 22,6% e GI1 = 12,3%; GI2 =28,8% e GI3 =27,7%.

Os grupos GC+, GS3 e GI3 tiveram redução no número total de espermatozóides e diferiram estatisticamente do grupo controle negativo. Apenas o grupo GS1 teve redução na produção diária de espermatozóides, diferindo dos demais grupos tratados e do grupo controle negativo.

A morfologia espermática é uma das medidas menos variável em indivíduos normais, o que pode aumentar a sua utilização na detecção de eventos de toxicidade espermática (ZENICK et al., 1994). A maioria dos estudos em espécies-teste e em seres humanos tem sugerido que espermatozóides anormais não podem chegar à tuba uterina ou participar da fertilização. A implicação é que quanto maior for o número de espermatozóides anormais na ejaculação, maior a probabilidade da fecundidade ser reduzida (NESTOR & HANDEL, 1984; REDI et al., 1984).

6.2. Exposição das fêmeas no período pré-acasalamento

Agentes químicos ou físicos podem afetar o sistema reprodutivo feminino em qualquer período do ciclo da vida, incluindo períodos suscetíveis no desenvolvimento. O sistema reprodutivo começa a ser formado no início da gestação,

mas a maturação estrutural e funcional se completa somente na puberdade (EPA, 1996a).

Os toxicologistas estão freqüentemente preocupados sobre como a mudança no peso corporal pode afetar a função reprodutiva. De fato, sabe-se que em fêmeas, o peso corporal flutua normalmente com o estado fisiológico do animal, porque estrogênio e progesterona influenciam na ingestão de alimentos e no consumo energético; as taxas de retenção de água e deposição de gordura também são afetadas. O consumo de alimento é elevado durante a gestação, em parte devido ao elevado nível de progesterona sérica (EPA, 1996a).

No presente estudo, a exposição das fêmeas às formulações fitoterápicas Soyfemme® e Isoflavine® em três doses, 4,3 mg.kg⁻¹, 21,5 mg.kg⁻¹ e 43 mg.kg⁻¹, durante o período de pré-acasalamento não alterou as massas absolutas dos órgãos reprodutivos útero e ovários, e dos órgãos fígado, rins e baço. Também não foram observados sinais macroscópicos de toxicidade nos órgãos analisados. No entanto, o ganho de massa corporal no período pré-acasalamento foi alterado nas doses 21,5 mg.kg⁻¹ e 43 mg.kg⁻¹ para os animais tratados com Soyfemme® e os tratados com Isoflavine® nas três doses, 4,3 mg.kg⁻¹, 21,5 mg.kg⁻¹ e 43 mg.kg⁻¹.

As taxas de acasalamento foram diferentes estatisticamente do grupo controle negativo nas três doses do fitoterápico Isoflavine® enquanto que nos grupos tratados com o fitoterápico Soyfemme®, apenas a dose maior, 43 mg.kg⁻¹ revelou-se estatisticamente diferente do grupo controle negativo na taxa de acasalamento.

Estes resultados apontam para a possível presença de toxicidade materna para as doses investigadas durante este período de exposição em ratas Wistar.

A sensibilidade limitada das medidas de fertilidade em roedores sugere também que um NOAEL, LOAEL, com bases na fertilidade poderão não refletir completamente a extensão do efeito tóxico. Nesses casos, os dados de parâmetros adicionais reprodutivos podem indicar que um efeito adverso poderia ocorrer com uma dose superior (OECD, 1998).

O padrão de eventos no ciclo estral fornece um indicador útil da normalidade da função neuroendócrina do ovário das fêmeas não gestantes. Além disso, proporciona um meio para interpretar medições em relação à fase do ciclo hormonal, histológicos, morfológicos e, e pode ser útil para monitorar a condição de acasalamento

das fêmeas. A normalidade do ciclo estral pode ser acompanhada no rato, observando as mudanças da citologia no esfregaço vaginal (LONG & EVANS, 1922; COOPER et al., 1993).

O ciclo estral e a citologia vaginal das fêmeas colocadas em acasalamento não foram monitorados em nenhuma das três fases do experimento, o diagnóstico de gestação era obtido nas horas seguintes do acasalamento mediante a presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. Aí pode estar a resposta para os resultados falso-positivos no diagnóstico de gestação encontrados no experimento. Tanto os grupos tratados quanto os grupo controle apresentaram diagnósticos de gestação positivos, mas não pariram a termo nem foram constatados implantes uterinos no final do período de gestação.

As conseqüências da deficiência no sistema reprodutor feminino das fêmeas que não emprenharam são também importantes e parâmetros para detectar os efeitos adversos sobre o sistema reprodutor das não-prenhes, quando disponível, pode ser útil na avaliação da toxicidade reprodutiva (EPA, 1996a).

As substâncias químicas podem atrasar ou impedir a ovulação pela desregulação ovulatória do hormônio luteinizante (LH) ou por interferir com a capacidade da maturação folicular para responder a esse sinal gonadotrópico (OECD, 1998).

6.3. Exposição das fêmeas no período de gestação e lactação

A avaliação dos dados de fertilidade e gestação é importante fonte de dados sobre a toxicidade reprodutiva e permite observar resultados das conseqüências funcionais de danos reprodutivos (EPA, 1996a).

A exposição das fêmeas às formulações fitoterápicas Soyfemme® e Isoflavine® em três doses, 4,3 mg.kg⁻¹, 21,5 mg.kg⁻¹ e 43 mg.kg⁻¹, durante o período de gestação e lactação não alterou o desenvolvimento ponderal das fêmeas tratadas, não alterou as massas absolutas dos órgãos reprodutivos e também não foram observados sinais macroscópicos de toxicidade nem lesões histopatológicas nos órgãos analisados.

Na avaliação de toxicidade reprodutiva, o índice de mortalidade é um sinal claro de toxicidade, no entanto, outras variáveis podem ser indicativas de efeitos

adversos mais sutis, como perda de massa corporal durante o tratamento, massa dos órgãos, dados da prenhez e sinais clínicos de toxicidade (diarréia, pilo ereção, sangramento, variações comportamentais). Alterações nos níveis plasmáticos hormonais nas progenitoras podem não levar a sinais de toxicidade materna, mas podem induzir toxicidade reprodutiva na prole. O tamanho da ninhada é influenciado pelo número de ovócitos viáveis para fertilização, pelas taxas de fertilização e implantação e pela proporção de embriões implantados que sobrevivem até o parto. Um agente químico pode interferir no desenvolvimento dos embriões diretamente, ou indiretamente, ao comprometer a capacidade da progenitora em sustentar a prole (EPA, 1991; EPA, 1996a).

Nas fases pré e pós-natal, os órgãos sexuais e o sistema nervoso central que ainda estão se diferenciando, podem ser atingidos por substâncias presentes no sangue materno através da placenta durante a gestação ou através do leite durante a lactação. Além disso, indivíduos expostos durante períodos críticos de desenvolvimento são mais vulneráveis à ação de substâncias químicas em função de menor capacidade metabólica e excretora e da ausência de muitos mecanismos de retro alimentação do sistema endócrino (ZENICK & KLEGG, 1989).

A implantação é o processo pelo qual o embrião realiza o contato físico e fisiológico íntimo com o endométrio materno para o estabelecimento da gestação. Apesar de haver variação neste processo entre espécies, certos eventos básicos são similares. A característica fundamental deste processo é o desenvolvimento sincronizado do embrião para o estágio de blastocisto e a diferenciação do útero para o estado receptivo. Em seguida ocorrem interações entre o blastocisto ativado e o epitélio uterino para iniciar a implantação (PARIA et al., 2000).

O tempo e integridade do transporte dos gametas e zigoto, importantes para a fertilização e sobrevivência embrionária, são bastante suscetíveis a perturbações causadas por compostos químicos. A perturbação desses processos contribui para a redução na taxa de fertilização e aumento da perda embrionária precoce que são identificados como perdas pré-implantação (EPA, 1996a). Durante o início da prenhez, a secreção de estrogênios ovarianos é responsável tanto para estimular a proliferação de células epiteliais do endométrio como para tornar o estroma uterino receptivo para a implantação (PARIA et al., 2000; SMITH, 2001). DAO et al. (1996) demonstraram que

substâncias anti-estrogênicas administradas nos três primeiros dias de prenhez em ratos possuem efeito anti-implantação.

No presente estudo a administração dos fitoterápicos Soyfemme® e Isoflavine® nas doses investigadas não interferiu na duração da prenhez e no número de filhotes nascidos nas fêmeas tratadas com Soyfemme® que pariram a termo, mas interferiu na taxa de natalidade na maior dose do fitoterápico Isoflavine® que apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo. Nas fêmeas que sofreram cesariana no 21º dia de gestação, nos dois grupos de fitoterápicos, nas doses mais altas utilizadas, houve diferença no número de filhotes, em relação ao grupo controle negativo, GS2 (21,5mg.kg⁻¹) e G11 (4,3mg.kg⁻¹) lembrando que nas demais doses não houve cesarianas, nem no grupo controle positivo.

No número de implantes, houve diferenças significativas entre os grupos tratados com grupo controle negativo, com Soyfemme®, nas três doses utilizadas houve perdas pós-implantação, no entanto, a dose maior, 43mg.kg⁻¹ foi a que mais causou perdas, enquanto que, nos animais tratados com Isoflavine® houve perdas pós-implantação nas duas doses utilizadas, 4,3mg.kg⁻¹ e 21,5mg.kg⁻¹.

As taxas de parto, viabilidade e desmame foram diferentes estatisticamente das taxas do grupo controle negativo. Na dose intermediária, 21,5mg.kg⁻¹, os animais tratados com Soyfemme® e Isoflavine® foram diferentes na taxa de parto. Na taxa de viabilidade, somente os tratados com Soyfemme® foram diferentes. Na taxa de desmame, apenas os animais tratados com Isoflavine® foram diferentes do grupo controle negativo.

Kang et al. (2002) investigaram a exposição de ratas Sprague Dawley a concentrações de genisteína compatíveis com as obtidas em humanos. A exposição oral de genisteína (0,4mg/kg e 4mg/kg) durante gestação e lactação sobre as variáveis reprodutivas de F1, mostrou que o número de filhotes nascidos vivos, sítios de implantação, proporção entre os sexos, distância ano-genital, abertura do canal vaginal não foram afetados.

O desenvolvimento ponderal e características gerais e sexuais das proles dos animais tratados com as duas formulações fitoterápicas à base de soja, não apresentaram alteração em relação ao grupo controle, com exceção da prole do grupo GS3, que se mostrou diferente do grupo controle negativo no desenvolvimento ponderal, durante

quinta semana de vida, mas logo após retornou ao desenvolvimento normal. A proporção de sexos dos filhotes nascidos e dos retirados do útero em cesariana apresentou proporção muito semelhante em todo o período de tratamento, nos dois grupos tratados.

Doerge et al. (2006) estudaram a transferência lactacional da isoflavona da soja, genisteína, em ratos Sprague Dawley. Este estudo sugere que a exposição de filhotes de ratos à genisteína através da lactação de fêmeas que consumiram dieta com genisteína, produz modestos níveis circulantes de aglicona e genisteína total.

Exposição pré-natal e pós-natal a tóxicos pode produzir mudanças que não podem ser previstas a partir dos efeitos observados em adultos, e esses efeitos são muitas vezes irreversíveis. Resultados adversos no desenvolvimento, em ambos os sexos podem resultar de exposição a agentes tóxicos no útero ou no leite (EPA, 1996a). Muitos desses efeitos tóxicos têm sido detectados em homens e mulheres expostos no período pré-natal com estrogênios, progesteronas, andrógenos e antiandrógenos (GIUSTI et al., 1995; HARRISON et al., 1995).

Ambas as formulações fitoterápicas não tiveram efeito significativo sobre o aparecimento da puberdade dos machos, como avaliado pela separação prepucial, e também não mostram uma tendência significativa para a aceleração da abertura do canal vaginal.

Gray e Ostby (1995) sugerem que produtos químicos estrogênicos ou antiestrogênicos podem atuar diretamente sobre o epitélio vaginal e alterar a idade em que ocorre o desenvolvimento vaginal. Dalsenter (1991) sugere que a utilização de plantas com atividade estrogênica pode ser responsável pela antecipação na abertura do canal vaginal de ratas.

Testes de comportamento têm sido utilizados para observar diferenças na reatividade de animais domésticos, quando submetidos a condições desafiadoras (LUÍS, 2007). O teste do campo aberto tem sido amplamente utilizado para quantificar movimentos locomotores e de exploração dos animais de laboratório. Os movimentos locomotores são deslocamentos entre um ponto a outro da arena. Os movimentos de exploração são aqueles que o animal pode realizar sem a necessidade de deslocamento, como por exemplo, elevação vertical, cheirar o ambiente e autolimpeza. Em experimentos com roedores, estes comportamentos são essenciais para compreender o

efeito de diferentes drogas psicoestimulantes (EILAN, 2003). Na avaliação realizada com teste de comportamento em campo aberto, cuja finalidade foi medir o nível de ansiedade na prole dos animais tratados e dos animais dos grupos controle, observou-se que a exposição das ratas aos fitoterápicos, não alterou o desempenho de seus filhotes. Não houve diferença entre os grupos tratados e o grupo controle negativo.

6.4. Considerações finais

Dado o leque de potenciais efeitos da soja e seus componentes e ao potencial de aumento no consumo de produtos que contêm soja, é importante realizar avaliações toxicológicas abrangentes desses agentes para entender melhor os potenciais efeitos adversos que poderiam resultar da sua utilização. Um crescente corpo de dados toxicológicos sobre as isoflavonas em roedores está se acumulando, o que confirma a importância da dose, tempo de dose, órgão alvo, rota e contexto de administração e as espécies sobre os efeitos.

O conceito de que a exposição de uma fêmea a produtos químicos tóxicos durante a gestação ou aleitamento é bem aceito, pode provocar a morte, anomalias estruturais, alterações no crescimento, ou déficits pós-funcional na sua descendência. Mas já existem dados suficientes com uma variedade de agentes para concluir que só exposição masculina também pode produzir efeitos nocivos na descendência (DAVIS et al., 1992; COLIE, 1993; SAVITZ et al., 1994). Os efeitos mediados paternalmente incluem perdas pré e pós-implantação déficits de crescimento e comportamentais, e malformações (QIU et al., 1995).

Correlacionando a morfologia espermática e o número total de espermatozoides dos grupos tratados e do controle positivo, com as taxas de acasalamento e gestação das fêmeas, pode-se dizer que a morfologia espermática interferiu nessas taxas, sendo os machos em parte, os responsáveis pela infertilidade das fêmeas. No entanto, no protocolo proposto não há como ter certeza, pois machos e fêmeas são tratados em todas as fases do acasalamento.

Amman (1982) sugere que só haverá redução nas taxas de acasalamento e gestação, quando houver redução maior que 60% na produção de espermatozoides normais nos ratos e que outro fator importante é que essas taxas são critérios de baixa

sensibilidade nos modelos animais, já que há alta variabilidade entre espécies utilizadas como modelos biológicos.

A hipófise dos animais não foi coletada, nem em machos nem em fêmeas. O peso da hipófise pode fornecer uma visão valiosa sobre o estado da reprodução animal (EPA, 1996a). Também não se avaliou a mobilidade espermática, o que é um importante instrumento para avaliar a toxicidade reprodutiva.

A descrição e avaliação do relacionamento da dose-resposta é um componente crítico na caracterização do perigo. Evidências de uma relação dose-resposta é um critério importante para estabelecer um efeito tóxico reprodutivo. Deve-se incluir a avaliação dos dados de humanos e estudos em animais de laboratório. A avaliação de relações dose-resposta inclui a identificação de efetivos níveis de doses, bem como doses que estão associados com baixo ou nenhum aumento da incidência de efeitos adversos, sempre comparados com controles (EPA, 1996a).

Sendo assim, é possível afirmar que as doses utilizadas nesse experimento, a dose terapêutica recomendada pelos fabricantes dos fitoterápicos e a utilização de cinco e 10 vezes esta dose terapêutica, foi suficiente para detectar alguns efeitos adversos das isoflavonas, na forma de formulações fitoterápicas da soja, sobre a fertilidade de ratos e ratas Wistar.

7. CONCLUSÕES

- A administração das formulações fitoterápicas Soyfemme® e Isoflavine® contendo soja [*Glycine max* (L.) Merr] a animais machos Wistar durante as fases de pré-acasalamento e acasalamento, nas doses 4,3mg.kg⁻¹, 21,5mg.kg⁻¹ e 43mg.kg⁻¹, atua diretamente nos epidídimos dos animais: altera o peso do órgão; provoca aumento na porcentagem de espermatozóides anormais de forma dose-dependente; na maior dose utilizada (43mg.kg⁻¹) causa redução no número total de espermatozóides.
- A administração da formulação fitoterápica Soyfemme® contendo soja [*Glycine max* (L.) Merr] a animais machos Wistar durante as fases de pré-acasalamento e acasalamento, nas doses 21,5mg.kg⁻¹ e 43mg.kg⁻¹, causa diminuição no peso do fígado e vesícula seminal dos animais tratados.
- A administração das formulações fitoterápicas Soyfemme® e Isoflavine® contendo soja [*Glycine max* (L.) Merr] a animais machos Wistar durante as fases de pré-acasalamento e acasalamento, nas doses 4,3mg.kg⁻¹, 21,5mg.kg⁻¹ e 43mg.kg⁻¹ não causa toxicidade sistêmica e não determinam lesões histológicas nos órgãos analisados.
- Nas fêmeas, a administração das formulações fitoterápicas Soyfemme® e Isoflavine® contendo soja [*Glycine max* (L.) Merr] durante as fases de pré-acasalamento, acasalamento, gestação e lactação, nas doses 21,5mg.kg⁻¹ e 43mg.kg⁻¹ ocasiona alteração no desenvolvimento ponderal no período pré-acasalamento, ocasiona aumento no número de reabsorções e modificação da taxas reprodutivas calculadas.
- A administração das formulações fitoterápicas Soyfemme® e Isoflavine® contendo soja [*Glycine max* (L.) Merr] durante o período de gestação e lactação, nas doses 4,3mg.kg⁻¹, 21,5mg.kg⁻¹ e 43mg.kg⁻¹ não altera os pesos dos órgãos sexuais nem nos demais órgãos analisados e não apresenta lesões histológicas nestes órgãos, não interfere no desenvolvimento ponderal da prole nem nas características de desenvolvimento geral e sexual.

- Os filhotes de fêmeas expostas antes, durante a gestação e lactação não apresentam alterações no teste de comportamento em campo aberto, realizado na prole aos 75 dias de vida.
- O grupo controle positivo contendo isoflavonas da soja, na concentração de 43% administrada aos ratos machos e fêmeas na dose de $4,3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, provoca aumento na porcentagem de espermatozóides anormais e altera as taxas reprodutivas calculadas nas fêmeas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, N.R. Detection of effects of phytoestrogens on sheep and cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 73:1509-1515, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) Resolução RE nº 88, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da LISTA DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS PARA AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DE FITOTERÁPICOS. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**. Publicado no dia 18 de março de 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acessado em: 20 jun. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC Nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**. Publicado no dia 18 de março de 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acesso em: 20 jun. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 89, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da LISTA DE REGISTRO SIMPLIFICADO DE FITOTERÁPICOS. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**. Publicado em 18 de março de 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acessado em: 20 jun. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determinar a publicação do GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**, publicado no dia 18 de março de 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acesso em: 20 jun. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 91, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da GUIA PARA REALIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES, INCLUSÕES, NOTIFICAÇÕES E CANCELAMENTOS PÓS REGISTRO DE FITOTERÁPICOS. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**, publicado no dia 30 de abril de 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 20 jun. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Lei nº 9279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**, publicado no dia de 15 de maio de 1996. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 20 jun. 2006.

ALBERTAZZI, P. et al. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. **Obstet Gynecol**, v. 91, pp 6-11. Jan, 1998.

ALLRED, C.D. et al. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. **Cancer Res**, v. 61, pp 5045-5050. Jul, 2001.

AMANN, R.P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **J. Androl**. V. 2:37-58, 1981.

AMANN, R.P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. **Fundam. Appl. Toxicol**, v.2 p. 13-25, 1982.

ANDERSON, D.; CONNING, D.M. **Experimental toxicology – The basic issue**. 2 ed. Cambridge: the Royal Society of Chemistry, 566p. 1993.

ANDERSON, J.W. et al. Meta-analysis of the effect of soy protein intake on serum lipids. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 333, pp 276-286. Aug, 1995.

ANDRADE, L.H.S.G.; GORESTREIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Rev. Psiquiatr. Clin.**, v. 25, n. 6, p. 285-290, 1998.

AZEVEDO, M.S. **Efeito de intervenções no ambiente neonatal sobre a relação mãe-filhote e o comportamento na idade adulta**. 2005, 100 folhas. Dissertação de mestrado em ciências biológicas: fisiologia. Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. An ethopharmacological analysis of defense fear and anxiety. In: McNAUGHTON, N.; ANDREWS, G. (Ed.). **Anxiety**. University of Otago Press. Dunedin, 1990. p. 124-133.

BLAZAK, W.F., ERNST, T.L., STEWART, B.E. Potential indicators of reproductive toxicity, testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time and motility in Fischer 344 rats. **Fundam. Appl. Toxicol**. V. 5:1097-1103, 1985.

BOSCHILIA, C. **Minimanual compacto de biologia: teoria e prática**. 2ª Ed, São Paulo, 400 p, 2003.

BREZEZINSKI, A., SCHENKER, J.C. Induction of ovulation and risk of breast cancer: an overview and perspectives. **Gynecol Endocrinol**, v. 11, pp 357-364. Oct, 1997.

CARDOSO, J.R. et al. Effects of chronic treatment with soy derived isoflavones on reproductive health of male rabbits. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 23, n. 1, p. 75-82, Jan./Mar. 2007.

CARRÃO – PANIZZI, M.C. et al. Effects of genetics and environment on isoflavones of soybean from different regions of Brazil. **Pesq Agropec Bras**. (34) 10, 1787 – 1795, 1999.

CASTRO, L.O., CHEMALE, V.M. **Plantas Mediciniais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo**. Guaíba: Agropecuária, 1995.

CHAPIN, R.E. et al.. The effects of feed restriction on reproductive function in Sprague-dawley rats. **Fundam. Appl. Toxicol**, v. 20, p 23-29, 1993.

CHAPIN, R.E., et al. The effects of feed restriction on reproductive function in Swiss CD-1 mice. **Fundam. Appl. Toxicol.** V. 20:15-22, 1993a.

CISOJA - Centro de Inteligência da Soja. Disponível em http://www.cisoja.com.br/index.php?p=aspectos_botanicos Acessado em 28 de setembro de 2007.

CLAPAUCH, R. et al. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arq Bras Endocrinol Metab**, vol.46, n.6, p 679-695, 2002.

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2 ed. São Paulo: H.A. Rothchild, 259, 1996.

COLIE, C.F. Male mediated teratogenesis. **Reprod. Toxicol.** V.7:3-9. 1993.

COOPER, R.L., GOLDMAN, J.M., VANDENBERGH, J.G. Monitoring of the estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. In: Heindel, J.J., Chapin, R.E. **Methods in Toxicology: Female Reproductive Toxicology**. Academic press, San Diego. pp. 45-56, 1993.

CRIAR E PLANTAR. Disponível em <http://www.criareplantar.com.br/agricultura/soja/soja.php?tipoConteudo=texto&idConteudo=1416>. Acessado em 23 out 2007.

DALSENTER, P.R. **Efeito dos extratos de Trifolium riograndense Bukart (Leguminosae) sobre a fertilidade de ratas albinas**. Porto Alegre: UFRGS, 1991, 86f. Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

DAO, B. et al. Anti-Implantation Activity of Antiestrogens and Mifepristone. **Contraception**, v. 54, n. 4, p. 253 – 258, 1996.

DAVIS, D.L., et al. Male-mediated teratogenesis and other reproductive effects: biologic and epidemiologic findings and a plea for clinical research. **Reprod. Toxicol.** 6:289-292. 1992.

DELCLOS, B. K. et al. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague Dawley) rats. **Reprod. Toxicol.**, v. 15, pp 647-663, 2001.

DOERGE, D. R. et al. Lactational transfer of the soy isoflavone, genistein, in Sprague–Dawley rats consuming dietary genistein. **Reprod. Toxicol.**, v. 21, p. 307–312, 2006.

DUKE, J.A. **Handbook of legumes of world economic importance**. New York, plenum Press, 1981.

DUNCAN, A.M. et al. Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers**, v. 9, pp 581-606. Jun, 2000.

EILAM, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behavioural Brain Res**, 142:53–62, 2003.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja. Disponível em www.cnpso.embrapa.br. Acessado em 08 jun 2006.

EPA - Environmental Protection Agency. **Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment**. Federal Register 56(234):63798-63826, 1991.

EPA - Environmental Protection Agency. **Guidelines for Estimating Exposures**. Federal Register 51(185):34042-34054, 1986.

EPA – Environmental Protection Agency. **Health effects test guidelines** – OPPTS 870:3800. Reproduction and fertility, 1996.

EPA – Environmental Protection Agency. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**. Federal Register 61(212):56274-56322. October, 1996a.

FAQI, A.S. et al. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. **Reprod. Toxicol.**, v. 18, pp 605-611, 2004.

FERNANDES, L. F. C.; ALDRIGHI, A. P. S.; ALDRIGHI, J.M. Prescrever ou não isoflavonas de soja à mulher no climatério?. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 52, n. 3, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302006000300007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 03 Jan 2008.

FIELDEN, M. R. et al. Effect of human dietary exposure levels of genistein during gestation and lactation on long-term reproductive development and sperm quality in mice. **Food. Chem. Toxicol.**, New York, v. 41, n. 4, p. 447-454, Apr. 2003.

FOLHAONLINE – JORNAL FOLHA DE SÃO PAULO – disponível em <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u347975.shtml>> Acessado em 14 nov 2006.

FOOTE, R.H., SCHERMERHORN, E.C., SIMKIN, M.E. Measurement of semen quality, fertility, and reproductive hormones to assess dibromochloropropane (DBCP) effects in live rabbits. **Fundam. Appl. Toxicol.** V. 6:628-637, 1986.

GIUSTI, R.M., IWAMOTO, K., HATCH, E.E. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. **Ann. Intern. Med.** 122:778-788, 1995.

GRAEFF, F. G. **Drogas psicotrópicas e seu modo de ação**. 2. ed. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1989.

GRAY, L.E., OSTBY, J.S. In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 133:285-294, 1995.

HARRISON, P.T.C. et al. **IEH Assessment on Environmental Oestrogens: Consequences to Human Health and Wildlife**. MRC Institute for Environment and Health. Leicester, UK, 1995.

HAYES, A.W. (ED.) **Principes and methods of toxicology**. 3 ed. New York: Raven Press, 1994.

HO, Y.J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. On functionals of linear processes with estimated parameters. **Behav Brain Res**.136p. 2002.

HUNTLEY, A.L., ERNST, E. Soy for de treatment of perimenopausal symptoms – a systematic review. *Maturitas* – **The Euro. menop. journal**, v. 47, pp 1-9, 2004.

HURTT, M.E., ZENICK, HDecreasing epididymal sperm reserves enhances the detection of ethoxyethanolinduced spermatotoxicity. **Fundam. Appl. Toxicol.** 7:348-353, 1986.

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Disponível em <http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=771> Acessado em 23 out 2007.

JU, Y.H. et al. Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. **Journal Nutr**, v.131, pp2957-2962. Nov, 2001.

JUNG, E-Y. et al. Effects of exposure genistein and estradiol on Reproductive Development in immature male mice weaned from dams adapted to soy-based commercial diet. **Journal Vet. Med. Sci**, v. 66, pp 1347-1354, Jun, 2004.

KANG, K. S., CHE, J. H., LEE, Y. S. Lack of adverse effects in the F1 offspring maternally exposed to genistein at human intake dose level. **Food. Chem. Toxicol.**, Volume 40, Issue 1, Pages 43-51, January 2002.

KU, W.W. et al Testicular toxicity of boric acid (BA): relationship of dose to lesion development and recovery in the F344 rat. **Reprod. Toxicol.** V.7:305-319, 1993.

KUMI-DAIKA J., RODRIGUES R., GOUDAZE G. Influence of genistein (4,5,7-trihydroxy-isoflavone) on the growth and proliferation of testicular cell lines. **Biol Cell**. v. 90:349–54, 1998.

KUMI-DIAKA, J.; RODRIGUEZ, R.; GOUDAZE, G. Influence of genistein (4',5,7 trihydroxyisoflavone) on growth and proliferation of testicular cell lines. **Biol. Cell.**, Colchester, v. 90, n. 4, p. 349-354, Jul. 1998.

LEE, B. J.; KANG, J. K.; JUNG, E. Y. Exposure to genistein does not adversely affect the reproductive system in adult male mice adapted to a soy-based commercial diet. **J. Vet. Sci.**, Suwon, v. 5, n. 3, p. 227-234, Sep. 2004.

LEMÔNICA, I.P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M.T.V.; SCHÜLER-FACCINI, **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/ UFRGS, p. 19 – 39, 2001.

LEMOS, M.L. Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. **Ann Pharmacother**, v. 35, pp 1118-1121. Sep, 2001.

LONG, J.A., EVANS, H.M. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Mem. Univ. Calif.** 6:1-111, 1922.

LUCION A.B. et al. Influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult male rats. **Physiol and Behav** 60: 1419-1423. 1996.

LUÍS, S.I. **Comportamento suíno, interações com ractopamina e suas possíveis implicações na qualidade da carne**, 2007, 98f. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) São Paulo, 2007.

MARANDU – Revista eletrônica do CTI – Centro de trabalho indigenista . disponível em <<http://www.trabalhoindigenista.org.br/marandu/atuais.pdf>. Acessado em 22 out 2007.

MARKOVITS, J. et al. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. **Cancer Res**, v. 48, pp 5111-7. Sep, 1989.

McVAY M.J., COOKE G.M., CURRAN I.H.A. Increased serum and testicular androgen levels in F1 rats with lifetime exposure to soy isoflavones. **Reprod. Toxicol.**, v. 18 p. 677–685, 2004.

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

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, pp 455 – 464, 2006.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, G. O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.

NACHTIGALL L. Isoflavones in the management of menopause. **J Brit Menopause Soc**, Suppl S1:8-11, 2001.

NAGAO, T. et.al. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. **Reprod Toxicol**, v. 15, pp 399-411, 2001.

NESTOR, A., HANDEL, M.A. The transport of morphologically abnormal sperm in the female reproductive tract of mice. **Gamete Res**. 10:119-125, 1984.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I. Possible consequences of pre- or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. **Endocr Chemical Environ**, v.3, p.24-52, 1995.

NORTH, K, GOLDING, J. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. **BJU Int** V.85:107-13, 2000.

OECD. The Validation of Test Methods Considered for Adoption as OECD Test Guidelines. **ENV/MC/CHEM** (98) 6. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development, 1998.

OLIVEIRA F., AKISSUE G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1989.

OSORIO-DE-CASTRO, C.G.S., PAUMGARTTEN, F.J.R. SILVER, L.D. O uso de medicamentos na gravidez. **Ciênc. saúde coletiva**, vol.9, no.4, p.987-996, Oct./Dec, 2004.

PARIA, B. C. et al. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. **Cell & Develop Biology**, v. 11, p. 67 – 76, 2000.

PARK, Y.K. et al. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Cienc Tecnol Aliment**. V. 03, no 3, pp 156 – 160, 2001.

PEDROSA R.C., YUNES R.A., FILHO C.V. Fármacos e Fitoterápico: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 1, 147-152, 2001.

PINTO LEON, J.C. **Efeitos do extrato de *Trifolium subterraneum* L. var. Yarlopp sobre a fertilidade e a musculatura in vitro de *Rattus rattus* var. albinos**. Porto Alegre: UFRGS, 1984. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984.

QIU, J., HALES, B.F., ROBAIRE, B. Damage to rat spermatozoal DNA after chronic cyclophosphamide exposure. **Biol. Reprod.** 53:1465-1473, 1995.

REDI, C.A., et al. Spermatozoa of chromosomally heterozygous mice and their fate in male and female genital tracts. **Gamete Res.** 9:273-286, 1984.

ROBERTS, D. et al. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. **Endocrine**, Tokyo, v. 13, n. 3, p. 281-286, Dec. 2000.

ROSS, M.H.; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. **Histologia Texto e Atlas**. 2.ed. São Paulo: Panamericana, 1989.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998.

SAVITZ, D.A., SONNENFELD, N.L., OLSHAN, A.F. Review of epidemiologic studies of paternal occupational exposure and spontaneous abortion. **Am. J. Ind. Med.** 25:361-383, 1994.

SECRETO, G. et al. Soy isoflavones and melatonin for the relief of climacteric symptoms: a multicenter, double-blind, randomized study. **Maturitas**, v. 47, pp 11-20, 2004.

SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **Amer J. Clin Nutr.** V.134, n.6, p.1333-1343, 1998.

SETCHELL K.D. & CASSIDY A. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. **Journal of Nutr.**, 129:758-767, 1999.

- SHIBAYAMA, T. et al. Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice. **Endocr. J.**, Tokyo, v. 48, n. 6, p. 655-663, Dec. 2001.
- SMITH, S. K. Regulation of angiogenesis in the endometrium. **Trends Endocrinol & Metabol**, v. 12, n. 4, p. 147 – 151, 2001.
- SMOLINSKE, S.C. Dietary supplement-drug interactions. **J Am Med Womens Assoc.** v. 54(4):191-195, 1999.
- SOUZA, V.C. & LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.
- TAKAHASHI, A. Soluble soybean fiber: a 3-month dietary toxicity study in rats. **Food and QuemToxicol**, v. 41, pp 1111-121, 2003.
- TAPIERO H., BA G.N., TEW K.D. Estrogens and environmental estrogens. **Biomed Pharmacother**, 56:36-44, 2002.
- TEEDE, H.J. et al. Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in man and postmenopausal women. **Journal Clin endocrinal Metab.**, v. 86, pp 3053-3060, Jul, 2001.
- THIGPEN, J.E. et al. Effects of the dietary phytoestrogens daidzein and genistein on the incidence of vulvar carcinomas in 129/J mice. **Cancer Detect Prev.** v. 25, pp 527-532. Jun, 2001.
- TIERRAMÉRICA- Medio ambiente y desarrollo – Disponível em <<http://www.tierramerica.net/2004/1009/particulo.shtml>> Acessado em 23 out 2007.
- UNFER V. et al. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Fertil Steril.** V. 82:145-8, 2004.
- UPMALIS, D.H. et al. Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tables in postmenopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Menopause**, v. 7, pp 236-242, Jul-aug, 2000.
- WANG, H.; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **J. Agric food Chem**, v. 44, p. 2377-2383, 1996.
- WANG, H; MRPHY, P.A. Isoflavones content in commercial soybean foods. **J. Agric food Chem.** V. 42:1666 – 1673, 1994.
- WILLIAMS J., et al. Semen analysis and fertility assessment in rabbits: statistical power and design considerations for toxicology studies. **Fundam. Appl. Toxicol.** V.15:651-665, 1990.
- WISNIEWSKI, A.B. et al. Exposure to genistein during gestation and lactacion demasculinizes the reproductive system in rats. **Journal of Urol**, v. 169, pp 1582 - 1586. April, 2003.

WIKIPÉDIA – A enciclopédia livre. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Soja>. Acessado em: 18 de outubro de 2006.

WOOD C.E. Effects of soy on the mammary glands of premenopausal female monkeys. **Fertil and Steril.** V. 85, Supplement 1, p.1179-1186, 2006.

WORKING, P.K. **Toxicology of the Male and Female Reproductive Systems.** Hemisphere, New York, 1989.

WYROBEK, A.J. An evaluation of human sperm as indicators of chemically induced alterations of spermatogenic function. **Mutat. Res.** V. 115:73-148, 1983.

VIANNA, M.R. et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of nonassociative learning task in the rat. **Learn Mem.**, n. 7, p. 333-340, 2000.

ZENICK, H., et al. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: Hayes, A.W. **Principles and Methods of Toxicology.** Raven Press, New York. pp. 937-988, 1994.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: A risk of assessment approach. In: **Principles and methods of toxicology.** In: New York: Raven Press, p. 275 – 309, 1989.

ZUANAZZI, J.A.S, Flavonoides. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento** 2º ed. Porto Alegre. Editora da Universidade, p. 589 – 516, 1999.