UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA E REPRODUTIVA

(Segmento I) do óleo essencial de *Olea europaea* em Ratos Wistar

RAQUEL LUÍSA BREUNIG

Orientador: Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello

PORTO ALEGRE

2019

**SUMÁRIO**

[1 DADOS DO PROJETO DE PESQUISA 4](#_Toc6842201)

[1.1 Instituição 4](#_Toc6842202)

[1.2 Pesquisador Responsável 4](#_Toc6842203)

[1.3 Colaboradores 4](#_Toc6842204)

[1.4 Local de execução 5](#_Toc6842205)

[1.5 Período 5](#_Toc6842206)

[1.6 Fontes de financiamento 5](#_Toc6842207)

[1.7 Recursos materiais 5](#_Toc6842208)

[1.8 Tema da pesquisa 5](#_Toc6842209)

[1.9 Problema da pesquisa 5](#_Toc6842210)

[1.10 Hipóteses 5](#_Toc6842211)

[2 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 6](#_Toc6842212)

[2.1 Avaliação toxicológica 8](#_Toc6842213)

[2.2 Testes sobre a toxicidade reprodutiva 9](#_Toc6842214)

[3 OBJETIVOS 10](#_Toc6842215)

[3.1 Objetivo geral 10](#_Toc6842216)

[3.2 Objetivo específico 10](#_Toc6842217)

[4 MATERIAIS E MÉTODOS 11](#_Toc6842218)

[4.1 Obtenção do Material Vegetal 11](#_Toc6842219)

[4.2 Protocolo Experimental de Toxicidade Crônica e Reprodutiva (Segmento I) 11](#_Toc6842220)

[4.2.1 Animais 11](#_Toc6842221)

[4.2.2 Justificativa do Número de Animais 13](#_Toc6842222)

[4.2.4 Acasalamento 14](#_Toc6842223)

[4.2.5 Eutanásia e avaliação dos machos 15](#_Toc6842224)

[4.2.6 Lactação e comportamento maternal 17](#_Toc6842225)

[4.2.7 Taxas Reprodutivas 17](#_Toc6842226)

[4.2.8 Variáveis Avaliadas 21](#_Toc6842228)

[4.3 Resultados e Análise Estatística 22](#_Toc6842229)

[4.4 Conduta com Animais, Ponto Final Humanitário e Classificação da Severidade dos Procedimentos 23](#_Toc6842230)

[5 DESCARTE DE RESÍDUOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS 26](#_Toc6842231)

[6 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES 26](#_Toc6842232)

[7 ORÇAMENTO 27](#_Toc6842233)

[REFERÊNCIAS 28](#_Toc6842234)

# 1 **DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

## 1.1 Instituição

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

## 1.2 Pesquisador Responsável

João Roberto Braga de Mello. Professor Titular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

## 1.3 Colaboradores

Mário Carlos Araujo Meireles, Dr. Professor Titular – Departamento de Veterinária Preventiva – Faculdade de Veterinária – UFPel

Márcia Kutscher Ripoll, Mestranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV – UFRGS.

André Luiz Lucero Batista, Mestrando no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV – UFRGS.

Fernanda Bastos de Mello, Drª. Professora Adjunta III, UFCSPA. Médica Veterinária, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Renata Osório de Faria, Drª. Professora Departamento de Veterinária Preventiva - Faculdade de Veterinária – UFPel

Marlete Brum Cleff, Drª. Departamento de Clinicas Veterinárias - Faculdade de Veterinária – UFPel

Stefanie Bressan Waller, Ms. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Veterinária - Faculdade de Veterinária – UFPel.

Gisele Seberino. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV – UFRGS.

Muriel Rodrigues Ferraz de Oliveira. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV – UFRG

## 1.4 Local de execução

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Farmacologia.

## 1.5 Período

Junho de 2019 a fevereiro de 2021.

## 1.6 Fontes de financiamento

Os recursos do projeto serão oriundos do próprio laboratório, do PPGCV (UFRGS), do PPGCV (UFPel) e/ou de fontes de financiamento CNPq, FAPERGS e outros.

## 1.7 Recursos materiais

Os equipamentos e materiais permanentes necessários para o execução e desenvolvimento do projeto estão disponíveis nos laboratórios envolvidos.

## 1.8 Tema da pesquisa

Avaliação do potencial tóxico do óleo essencial de Olea europaea através de um estudo para avaliação da toxicidade crônica e reprodutiva.

## 1.9 Problema da pesquisa

O óleo essencial de Olea europaea causa efeitos tóxicos no que se refere à toxicidade crônica e reprodutiva que impossibilitem ou restrinjam sua utilização como fármaco

## 1.10 Hipóteses

O óleo essencial de Olea europaea não apresenta potencial in vivo de exercer toxicidade sobre a fertilidade antes e durante o período de acasalamento.

# 2 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novas drogas através de substâncias extraídas de plantas com potencial terapêutico tem sido o foco de muitos cientistas em diferentes regiões do planeta (HUSSAIN *et al.,* 2011). Estima-se que 33% de todas as novas substancias químicas lançadas no mercado são oriundas de produtos naturais (SILVA *et al.*, 2008). A busca por fármacos provenientes de fontes naturais com ação antimicrobiana vem aumentando devido ao seu baixo custo, facilidade de acesso e por serem renováveis (PEREIRA, 2009; VENTUROSO *et al.,* 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a importância do uso de plantas medicinais, principalmente em países em desenvolvimento, como uma alternativa viável e de baixo custo. É estimado que, 80% da população mundial depende do uso da medicina tradicional para suas necessidades de cuidados primários de saúde (WHO, 2005).

Os óleos essenciais são substâncias extraídas, através de processos específicos, de diversas espécies de vegetais, e que contém variável poder aromatizante. (OOTANI *et al*., 2013). Nas plantas, essas substâncias estão envolvidas em diversas funções essenciais no seu ciclo de vida, como atração de agentes fecundadores e também na defesa contra predadores e micro-organismos (SIANI *et al.,* 2000).

Popularmente conhecida como oliveira, a *Olea europaea* é uma planta originária da Bacia do Mediterrâneo, pertencente à família das Oleaceae e é a única espécie da família que produz frutos comestíveis, a azeitona, de onde é extraído o óleo de oliva, também chamado de azeite (OLIVEIRA *et al.,* 2003).

Fisiologicamente os vegetais possuem dois tipos de metabólitos, os primários e os secundários, sendo o primário responsável pela sobrevivência da planta e o secundário por sua defesa e que pode ser separado em três grandes grupos: os compostos fenólicos, terpenos e compostos que contém nitrogênio (TAIZ & ZEIGER, 2004). A composição das variáveis de azeitonas destinadas a extração é de aproximadamente 80% de ácido oléico (ácido graxo ω-9 monoinsaturado) e razoáveis quantidades de ácidos graxos essenciais, o que lhes confere propriedades nutricionais especiais, pois estudos mostram que a incidência de doenças coronarianas é menor em indivíduos que tem o hábito de consumir ácidos graxos ω-9, quando comparados com indivíduos que consomem gordura saturada (ALBA, 2008; PEIXOTO *et al*., 1998). Outros componentes benéficos das azeitonas são os tocofenóis, vitaminas do complexo B que são ricas em antioxidantes, minerais diversos e compostos fenólicos como a oleuropeina, tyrosol, hidroxityrosol (BOBBIO E BOBBIO, 2003; BOSCKOU, 1996; JUVEN & HENIS, 1970). A oleuropeína é o principal componente presente tanto nas folhas como nos frutos da oliveira, todavia a composição dos fenóis presentes nos extratos pode variar consideravelmente, podendo essa variação ser resultante tanto da colheita, como do processamento da amostra (MELLO & PINHEIRO, 2012).

Uma das propriedades da oleuropeína é sua ação antioxidante, de modo que o azeite de oliva se mostrou eficaz no tratamento de doenças crônicas como as cardiovasculares e o diabetes, devido a sua atividade moduladora de radicais livres (MELOO & PINHEIRO 2012; MARKIN *et al.,* 2003). Benavente *et al.* (2000) relataram ainda, que o óleo de oliva tem potencial antioxidante superior a vitamina C e E. Sugerindo que essa ação seja devido a sua fração fenólica (BENAVENTE *et al.,* 2000; HAYES *et al*., 2011; LEE *et al*., 2009; SILVA *et al.,* 2006). O extrato de folha de oliveira e seus compostos fenólicos, apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus, leveduras, fungos e alguns parasitas (JUVEN & HENIS, 1970; FLEMING *et al*., 1973; MAHJOUB & BULLERMAN, 1987; GOURAMA *et al*.1989; TRANTER *et al.,* 1993; TASSOU & NYCHAS, 1995; BISIGNANO *et al.,* 1999; McDONALD *et al.*, 2001; TUCK & HAYBALL, 2002; KORUKLUOGLU *et al.,* 2004; MICOL *et al.,* 2005).

Nas últimas décadas tem se notado um aumento da incidência de infecções fungicas, e consequentemente, um aumento na resistência desses microrganismos sobre os antifúngicos disponíveis no mercado. No cenário farmacológico atual, a maioria desses antifúngicos apresentam inúmeros problemas relacionados a eficácia, custo e toxicidade. Dessa maneira, os fitoterápicos surgem como uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que a demanda por produtos mais seletivos e com menor efeito tóxico é crescente. Todavia, o uso indiscriminado de plantas medicinais é preocupante, uma vez que podem surgir efeitos abortivos, teratogênicos e embriotóxicos, devido ao fato de que constituintes da planta podem atravessar a barreira placentária (ABAD *et al*., 2007; BRASIL, 2002).

Para garantir a utilização dos óleos essenciais livre de risco, são necessários estudos toxicológicos, tendo em vista que os mesmos são produtos mais concentrados de extração de uma espécie vegetal, tendendo assim, a apresentarem uma toxicidade maior que a planta em si. Apesar do crescente interesse do uso de fitoterápicos com finalidades terapêuticas, ainda existem poucos estudos que apresentem informações sobre a toxicidade dos mesmos. De modo que a maioria dos fitoterápicos utilizados atualmente não tem um perfil toxicológico bem delineado (SIMÕES *et al.,* 2000; VEIGA JUNIOR, 2008).

## 2.1 Avaliação toxicológica

A legislação brasileira e internacional exige que fitoterápicos e fármacos sejam produzidos ou disponibilizados no mercado para consumo somete após a avaliação rigorosa de suas características. Para tal, devem ser realizados testes que determinem suas atividades toxicológicas e seu potencial mutagênico (SILVA *et al*, 2003).

As exigências quanto as avaliações necessárias para a regulamentação de fármacos e fitoterápicos diferem nos diversos países ou blocos econômicos, mas em geral, os principais protocolos seguidos são os emitidos pela Europa através da Organization for Ecoomic Cooperation and Development (OECD), pelos Estados Unidos da América através do Food and drug Administration (FDA) (SILVA *et al*, 2003).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é quem regula o registro de medicamentos fitoterápicos para uso humano no Brasil, e prevê a realização de estudos de toxicidade pré-clínica. O guia emitido por esse órgão indica métodos padronizados para estudos de toxicidade pré-clínica para fitoterápicos, incluindo toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas (longa duração), e avaliação toxicológica de medicamentos fitoterápicos de uso tópico. De modo que ensaios de toxicidade reprodutiva são necessários quando o medicamento for indicado para gestantes ou uso de longa duração (ANVISA, 2004).

Essa regulamentação é de suma importância, uma vez que a busca por plantas medicinais é grande por gestantes, na tentativa de tratar sintomas decorrentes da gestação, principalmente por acreditarem que os fitoterápicos não causam prejuízo ao feto. Todavia, inúmeras substâncias de origem vegetal, apresentaram potencial teratogênico em experimentos em animais (CAMPESATO, 2005). O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão responsável pelo registro de medicamentos de uso veterinário, faz as mesmas exigências quanto a avaliação toxicológica, descritas no Decreto 5.053 de 2004 e Portaria 54 de 1999 (BRASIL, 2004).

## 

## 2.2 Testes sobre a toxicidade reprodutiva

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

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

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

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

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

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 Objetivo geral

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

## 3.2 Objetivo específico

Avaliar os efeitos do óleo essencial de *Olea europaea* sobre a fertilidade de ratos Wistar, machos e fêmeas, formação e maturação espermática, acasalamento e fertilização, desenvolvimento pré-natal, parto e desenvolvimento pós natal, com machos tratados antes e durante o acasalamento e fêmeas antes e durante o acasalamento, na gestação e lactação (Segmento I).

# 4 MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1 Obtenção do Material Vegetal

Serão analisadas cinco variedades distintas da *Olea europaea* (arbequina, koroneiki, picual, coratina e frantoio), produzidos na Fazenda Guarda Velha (31º30’02”S; 53º30’29”O), no município de Pinheiro Machado/RS. As folhas secas e o fruto (bagaço) das plantas serão encaminhados ao Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

O óleo essencial será obtido através de extração das folhas secas e do bagaço com arraste de vapor em aparelho *Clevenger*, segundo Farmacopeia Brasileira IV, durante 4 horas. Após a obtenção do óleo, serão dessecados com sulfato de sódio anidro p.a, armazenado em frasco âmbar, e mantido sob refrigeração até a utilização (BRASIL, 2010; SANTIN, 2013).

Será injetado 1µL de soluções de concentrações variadas dos padrões em cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massa (GC/MS) acoplado a um detector de ionização de chama. Os constituintes serão identificados por comparação entre o tempo de retenção dos padrões e das amostras (BRASIL, 2010).

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

### 4.2.1 Animais

Serão utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*) (40 machos e 120 fêmeas) com idade inicial de 90 dias e com padrão sanitário convencional, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL). O número de animais utilizados segue os protocolos de toxicidade reprodutiva aprovados pelos órgãos regulamentadores FDA, OECD e ANVISA, onde, para estudos de toxicidade envolvendo multigerações, preconiza-se que sejam obtidas pelo menos 20 gestações para cada grupo em cada geração (EPA, 1996).

Durante todo o período experimental, os animais serão mantidos no CREAL em condição constante de umidade (30-70%), temperatura (21ºC ± 2) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 8h00min às 20h00min). Serão alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum*.

Os machos serão mantidos em caixas de polipropileno individuais medindo 40 x 33 x 18 cm contendo maravalha, pois durante o período de acasalamento serão adicionadas três fêmeas na caixa de cada macho. Exceto durante o período de acasalamento e gestação, as fêmeas serão mantidas em grupos de cinco animais por caixa de polipropileno medindo 40 x 33 x 18 cm, visando proporcionar melhor bem-estar aos animais, tendo em vista que a espécie utilizada no experimento é sociável e vive em grupo. Para que haja um monitoramento do consumo de água e ração durante os períodos de acasalamento e gestação, as fêmeas serão mantidas em caixas de polipropileno individuais contendo maravalha, com as medidas de 40 x 33 x 18 cm.

O alojamento, manejo e eutanásia dos animais seguirão a Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008) e o Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009 (BRASIL, 2009), e os princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016). Bem como, a Resolução Normativa Nº 37, de 15 de fevereiro de 2018 e as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2018). Serão observadas, também, as orientações da Resolução Nº 1.000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012) e o “Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais”, elaborado pela Comissão de Ética, Bioética e Bem-estar Animal do CFMV (2012).

A fase experimental somente será iniciada após aprovação pelo Comitê de Ética na Utilização dos Animais da UFRGS.

Conforme o Guia de Severidade dos Procedimentos Científicos (CEUA/UFRGS, 2009), estudos de toxicidade crônica com desfecho não letal são caracterizados como de grau moderado. Todos os procedimentos do ensaio serão conduzidos por profissionais habilitados, visando minimização o sofrimento animal e aplicação de sacrifícios humanizados.

### 4.2.2 Justificativa do Número de Animais

O número de animais utilizado segue os protocolos de toxicidade reprodutiva aprovados pelos órgãos regulamentadores FDA, OECD e ANVISA, onde, para estudos de toxicidade envolvendo multigerações, preconiza-se que sejam obtidas pelo menos 20 gestações para cada grupo em cada geração (EPA, 1996). Considerando-se a taxa de prenhez esperada entre 70 e 75%, foram definidos grupos teste e controle contendo 30 fêmeas cada.

4.2.3 Delineamento Experimental

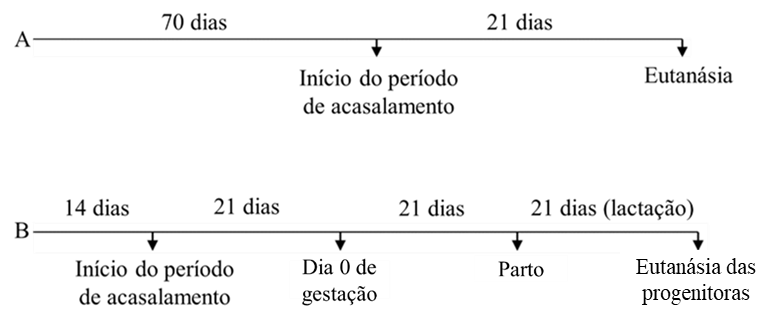
A toxicidade será avaliada utilizando-se três doses espaçadas geometricamente, conforme recomendado pela OECD/OCDE (2001) e FDA (1994). Segundo a OECD/OCDE (2001), deve ser escolhida a menor dose que não tenha produzido qualquer toxicidade materna ou no desenvolvimento fetal (NOAEL), a dose intermediária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

O volume administrado será idêntico em todos os grupos. Todos os animais serão tratados diariamente, por via oral, através de sonda gástrica flexível em volume correspondente a 10 ml/kg. A diferença será a dose de óleo essencial na solução administrada, que será de 2000 mg/kg/dia, 1000 mg/kg/dia e 500 mg/kg/dia. Dessa forma, os grupos serão divididos da seguinte maneira:

* GRUPO I. **Controle negativo** – tratado com emulsão contendo Tween 80 (3%) e água destilada (MONDELLO et al., 2006).
* GRUPO II. **Dose 1** – tratado com 2000 mg/kg/dia de óleo essencial diluído em emulsão contendo Tween 80 (3%) e água destilada.
* GRUPO III. **Dose 2** – tratado com 1000 mg/kg/dia de óleo essencial diluído em emulsão contendo Tween 80 (3%) e água destilada.
* GRUPO IV. **Dose 3** – tratado com 500 mg/kg/dia de óleo essencial diluído em emulsão contendo Tween 80 (3%) e água destilada.

Após o período de adaptação de 7 dias, os animais serão divididos nos 4 grupos descritos, cada um composto por 30 fêmeas e 10 machos (3 fêmeas para cada macho). Os machos serão tratados por 70 dias antes e 21 dias durante o acasalamento. As fêmeas serão tratadas antes do acasalamento (14 dias), durante o acasalamento (21 dias), durante a gestação (21 dias) e até o final da lactação (21 dias pós-parto). Na figura 1 podemos observar, de forma ilustrativa, uma linha do tempo do experimento.

**Figura 1.** Linha do tempo de tratamentos. Período em que os tratamentos serão realizados aos animais no segmento I (**A** – machos, **B** – fêmeas).



### 4.2.4 Acasalamento

O acasalamento será realizado em três ciclos de cinco dias consecutivos e intervalo de 48 horas entre eles, totalizando 21 dias. Três fêmeas virgens e nulíparas serão alocadas na caixa de cada macho, permanecerão no local durante duas horas por dia (das 6h00min às 8h00min) correspondente ao final do ciclo escuro. Após este período, os animais serão separados e a confirmação da concepção ocorrerá mediante observação da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal das fêmeas. O mesmo será realizado diariamente, através de lavado vaginal e visualizado em aumento de dez vezes com auxílio de microscópio óptico.

A constatação de esfregaço vaginal positivo indicará o dia zero da gestação. Estes dados serão posteriormente confirmados pela data de parto, de forma a avaliar a eficiência da metodologia.

### 4.2.5 Eutanásia e avaliação dos machos

Os machos serão eutanasiados 48 horas após o término do período de acasalamento, sendo 48 horas o período necessário para a recuperação quantitativa adequada das células reprodutivas dos machos, de modo que esse período se faz necessário para que não haja diferença na avaliação quantitativa (número de espermatozoides e número de espermátides) daqueles machos que cobrirem as fêmeas no dia do termino do acasalamento (dia 21) em relação àqueles que não realizarem a cobertura nesse dia, ocorrendo dessa maneira a uniformização entre os animais do grupo e também entre os grupos.

O método de eutanásia utilizado será o inalatório e o agente anestésico será o isoflurano. Optou-se pelo uso do isoflurano devido a sua rápida ação. Os animais serão colocados em uma gaiola fechada, juntamente com um recipiente contendo algodão embebido com isoflurano. O algodão será mantido em um recipiente fechado para que os animais não tenham contato direto com o líquido do algodão (FANTONI et al., 2011; CFMV, 2012; CONCEA, 2018). Após a eutanásia os animais serão submetidos à celiotomia.

As coletas de amostras sanguíneas serão obtidas a partir de venopunção da veia cava caudal sob visualização direta. O sangue será armazenado em tubos sem anticoagulante. Após a retração do coágulo, o sangue será centrifugado por 15 minutos a 2500 rpm, para obtenção de soro, sendo o mesmo acondicionado em microtubo e mantido a -20ºC até a realização dos exames de determinação da dosagem hormonal de testosterona.

Rins, fígado, baço e coração serão removidos e avaliados em relação a possíveis alterações macroscópicas. A massa de cada órgão será mensurada e relacionada com a massa corporal do indivíduo. Os órgãos sexuais, testículos, epidídimos, ductos deferentes, próstata e vesícula seminal serão removidos. A massa destes órgãos também será mensurada, exceto os ductos deferentes, e relacionada com a massa corporal. A vesícula seminal deverá estar livre de seu conteúdo para pesagem.

A túnica albugínea e os vasos principais de cada um dos testículos serão removidos, e cada testículo será 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 será repetido com a cauda de cada um dos epidídimos dos animais, previamente cortada com tesoura em pequenos pedaços.

O macerado resultante de cada testículo e de cada epidídimo será acondicionado em microtubos individuais, sendo retirado de cada macerado, um volume correspondente a 100µL. Cada microtubo será acrescido de 900µL de solução de NaCl 0,9%, chegando a um volume final de 1 mililitro.

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

S = C x FC x V (espermatozoides)

S = C x FC x V ÷ 6,1 (produção diária)

Onde:

S = soma total por animal

C = número de espermatozoides ou espermátides contados

FC = fator câmara (1,250)

V = diluição (106)

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

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

### 4.2.6 Lactação e comportamento maternal

As progenitoras parirão a termo e serão avaliadas desde o parto até o 21º de lactação. O comportamento da rata lactante com sua ninhada será registrado em vídeo, por câmera filmadora, no 1º, 5º e 10º dia pós-parto, durante o período claro. Os registros em vídeo serão realizados por 30 minutos a partir do momento em que a rata for colocada na caixa após os procedimentos experimentais (gavagem). Os comportamentos a serem observados durante o registro serão o ato de lamber os filhotes e a amamentação com o dorso arqueado.

No 21º dia da lactação, as progenitoras serão eutanasiadas com sobredosagem de isoflurano, do mesmo modo do executado nos machos (FANTONI et al., 2011; CFMV, 2012; CONCEA, 2018). Após, serão removidos e inspecionados o fígado, baço, coração, rins, ovários e útero. Cada órgão será pesado individualmente em balança analítica. No útero serão contados os implantes uterinos presentes.

### 4.2.7 Taxas Reprodutivas

* Taxa de acasalamento

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

Nº de fêmeas com espermatozoides no esfregaço vaginal x 100

Nº de fêmeas acasaladas

* Taxa de gestação

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

Nº de fêmeas prenhes x 100

Nº de fêmeas com espermatozoides no esfregaço vaginal

* Taxa de parto

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

Nº de fêmeas paridas a termo x 100

Nº de fêmeas prenhes

* Taxa de natalidade

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

Nº de filhotes nascidos vivos x 100

Nº de filhotes nascidos

* Taxa de viabilidade

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

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

Nº de filhotes nascidos vivos

* 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.

Nº de filhotes ao desmame x 100

Nº de filhotes nascidos vivos

### 

Após o desmame (21º dia de lactação) os animais serão colocados em caixas coletivas, por ninhada, e ao final do acompanhamento do desenvolvimento físico geral e sexual (aproximadamente 40 dias de vida) serão entregues para a mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Muriel Rodrigues Ferraz de Oliveira. Serão, então, utilizados no projeto intitulado “Avaliação da Toxicidade Peri e Pós-Natal (Segmento III) do Óleo Essencial de *Olea europaea* em Ratos Wistar”.

### 4.2.8 Variáveis Avaliadas

Nos machos, as variáveis a serem avaliadas serão:

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

Nas fêmeas serão avaliados:

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

Nos filhotes serão avaliados:

* Alterações macroscópicas externas em todos os filhotes nascidos;
* Número de filhotes por ninhada;
* Número de machos e fêmeas nascidos;
* Número de filhotes nascidos vivos;
* Número de filhotes nascidos mortos;

## 4.3 Resultados e Análise Estatística

As variáveis quantitativas referentes à influência das diferentes doses do óleo essencial de *Olea europaea* sobre o desenvolvimento ponderal dos animais de cada grupo, o consumo de água e de ração, a massa relativa dos órgãos de machos e fêmeas, o número de espermatozoides e produção diária, as variáveis reprodutivas referentes às fêmeas que parirem a termo e às fêmeas que sofrerem cesariana, o desenvolvimento ponderal das progênies (individual ou geral), serão comparadas através da análise de variância (ANOVA). Sempre que se fizer necessária comparação entre médias, será utilizado o Teste de Bonferroni.

As variáveis qualitativas referentes às taxas reprodutivas calculadas, ao percentual de alterações morfológicas nos espermatozoides e ao desenvolvimento das características gerais e sexuais das progênies, serão calculadas através de Teste Qui-quadrado, todas respeitando os valores estatisticamente significativos. Os programas a serem utilizados para efetuar essa análise serão o SPSS para Windows 8.0 e o EXCEL (LAPPONI, 2000).

## 4.4 Conduta com Animais, Ponto Final Humanitário e Classificação da Severidade dos Procedimentos

Todos os procedimentos a serem realizados neste projeto apresentarão os princípios de condutas que permitam garantir o cuidado e o manejo ético dos animais utilizados para fim científico, com base na “Diretriz Brasileira Para Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA” (CONCEA, 2016).

Serão levados em consideração os preceitos vigentes na Lei n° 11.794, de 2008 (BRASIL, 2008). O bem-estar dos animais será avaliado diariamente através de observações do comportamento e consumo de água e ração pelos animais. Os animais também serão monitorados durante e após os procedimentos, principalmente nos procedimentos de tratamento (gavagem). Os seguintes sinais serão observados: mudanças no padrão de sono, hidratação, higiene e comportamento exploratório; comportamento agressivo ou anormal, depressão, postura ou movimentos anormais, vocalização anormal, alteração da função cardiovascular ou respiratória, apetite anormal, vômitos e defecação, declínio no peso corporal, alteração da temperatura corporal, hemorragias, abortamento e diurese anormal (CONCEA, 2016). Quando estes sinais forem detectados, medidas cabíveis serão tomadas para impedir ou minimizar suas consequências para os animais. Caso não seja possível o alívio da dor ou do distresse, o animal será removido do projeto e será realizada a eutanásia humanitária, sendo o método utilizado o inalatório e o agente anestésico será o isoflurano.

A imobilização dos animais, quando necessária, será adequada à manutenção do bem-estar animal, por curto período de tempo e manterá a segurança de quem maneja o animal.

O alojamento, manejo e eutanásia dos animais seguirão a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008) e o Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009 (BRASIL, 2009), e os princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016). Também serão observadas as orientações da Resolução Nº 1.000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012) e o “Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais”, elaborado pela Comissão de Ética, Bioética e Bem-estar Animal do CFMV (2012).

A etapa experimental somente será iniciada após aprovação pelo Comitê de Ética na Utilização dos Animais da UFRGS.

Conforme o “Guia de Severidade dos Procedimentos Científicos” (CEUA/UFRGS, 2009), estudos de toxicidade crônica com desfecho não letal são caracterizados como de grau moderado. Todos os procedimentos do ensaio serão conduzidos por profissionais habilitados, visando minimização do sofrimento animal e aplicação de sacrifícios humanizados (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição de cada procedimento a ser realizado nos animais, o grau de severidade e os critérios estabelecidos para determinar o grau de severidade de acordo com as recomendações do Guia de Severidade dos Procedimentos Científicos CEUA-UFRGS.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Procedimento** | **Grau de Severidade** | **Critérios** |
| Gavagem | Moderado | As substâncias apresentarão impactos leves no animal.  Os volumes respeitarão os limites apropriados para o tamanho e a espécie do animal.  Procedimento será realizado diariamente, durante 90 dias em machos adultos e 77 dias em fêmeas adultas do segmento I.  Causará desconforto e possivelmente dor de intensidade leve, por curto período de tempo. |
| Pesagem | Leve | Manipulação diária causando desconforto leve. |
| Alojamento | Leve | Os animais terão alojamento solitário por longo período do experimento, envolvendo privação social. |
| Acasalamento | Leve | Manipulação de comportamento. |
| Esfregaço Vaginal | Moderado | Contenção, desconforto moderado gerado diariamente até a constatação da prenhez. |
| Avaliação Comportamental | Leve | Os animais serão observados e sofrerão perturbação leve. |
| Eutanásia | Sem recuperação | Procedimento de eutanásia humanizada, com todos os animais sob anestesia geral. |

# 5 DESCARTE DE RESÍDUOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

O descarte dos resíduos químicos gerados durante a execução dos ensaios seguirá o Plano de Gestão de Resíduos em Serviço de Saúde da UFRGS, de acordo com a RDC 306 de 2004.

Após eutanásia dos animais e coleta de material específico para os ensaios de Toxicidade Crônica e Reprodutiva (Segmento I), a carcaça e demais resíduos biológicos oriundos desses processos, serão acondicionados em saco plástico branco, com indicação de risco biológico, e serão descartados conforme o Plano de Gestão de Resíduos em Serviço de Saúde da UFRGS, de acordo com a RDC 306 de 2004. O descarte dos cadáveres, carcaças e do lixo gerado pelo uso de animais também seguirá a Política Nacional de Resíduos Sólidos, Lei nº 12305 de 2 de agosto de 2010.

# 6 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Período** | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **Etapa** | Ano | | 2019 | | | | 2020 | | | | | | 2021 | | | | | |
| Trimestre | | 1º | 2º | 3º | 4º | 1º | 2º | | 3º | | 4º | 1º | 2º | | 3º | | 4º |
| Revisão Bibliográfica | |  | | x | x | X | x | x | x | | x | | x |  | |  |  | |
| Submissão ao Comitê de ética | |  | | x |  |  |  |  |  | |  | |  |  |  | |  | |
| Ensaios | |  | |  | x | X |  |  |  | |  | |  |  |  | |  | |
| Análise de Resultados | |  | |  |  |  | x | x | x | | x | | x |  |  | |  | |
| Elaboração e Defesa da Dissertação | |  | |  |  |  |  | x | x | | x | | x |  |  | |  | |

Observação: O período do mestrado será de março de 2019 a março de 2021.

# 7 ORÇAMENTO

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Unidade** | **Material de Consumo** | **Valor Unitário** | **Valor Total** |
| 20 | Óleo essencial de *Olea europaea* (500 ml) | R$ 600,00 | R$ 12.000,00 |
| 01 | Padrão cromatográfico | R$ 557,00 | R$ 557,00 |
| 01 | Ponteiras de 1 até 200 µl (milheiro) | R$ 40,00 | R$ 40,00 |
| 01 | Ponteiras de 0,5 até 1 ml (milheiro) | R$ 40,00 | R$ 40,00 |
| 44 | Seringa (1 ml) | R$ 0,50 | R$ 22,00 |
| 50 | Seringa (5 ml) | R$ 0,40 | R$ 20,00 |
| 01 | Eppendorf (milheiro) | R$ 58,00 | R$ 58,00 |
| - | Vidraria variada (Becker, balões volumétricos, pipetas, lâminas, lamínulas, etc.) | R$ 420,00 | R$ 420,00 |
| - | Fármacos e reagentes | R$ 1.000,00 | R$ 1.000,00 |
| - | Material cirúrgico diverso | R$ 300,00 | R$ 300,00 |
| **Total** |  |  | R$ 14.457,00 |

# REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural source. **ARKIVOC**, v. 2007, n. 7, p.116-145, 2007.

ALBA, J. Elaboración del aceite de oliva virgen. In: BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (Ed.). **El cultivo del olivo**. 6. ed. Madri: Mundi-Prensa-Junta de Andalucia, p. 657-697. 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia Para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos.** RESOLUÇÃO - RE Nº 90, DE 16 DE MARÇO DE 2004.

BENAVENTE-GARCIA, O., CASTILLO, J., LORENTE, J., ORTUNO, A., & DEL RIO, J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves. **Food Chemistry,** 68(4), 457-462, 2000.

BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. São Paulo: Varela, 2003.

BOSKOU, D. Olive oil: chemistry and technology. Champaign: **AOCS,** 1996.

BRASIL. **Decreto n. 6.899**, de 15 de julho de 2009. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm>. Acesso em: 15 abr. 2019.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Vol.1. 5ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 548p.

BRASIL. **Lei n. 11.794**, de 8 de outubro de 2008. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Portaria 48**, de 16 de março de 2004. Diário Oficial da União, 18.03.2004.

CAMPESATO, V.R.; Uso de Plantas Medicinais Durante a Gravidez e Risco para Malformações Congênitas. **Tese de Doutorado** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

CASTRO, V. L. Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-Filhote Expostos a Agroquímicos. Circular técnica 13, **Embrapa Meio ambiente**, Jaguariúna, SP. 2006.

CEUA/UFRGS. **Expert working group on severity classification of scientific procedures performed on animals.** Final Report. 2009. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/report_ewg.pdf> >. Acesso em: 15 abr. 2019.

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

CHRISTIAN, M. et al. The toxicity of hydrolyzes aqueous olive pulp extract. **Drug and Chemical Toxicology**. v. 27, n. 4, p. 309-330, 2004.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretriz brasileira para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos** – DBCA. Brasília: CONCEA, 2016.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução Normativa nº 37 de 15 de fevereiro de 2018**. Brasília: CONCEA, 2018.

EBISUI, L.; FONTES, R.S.; LAPCHIK, V.B.V. Rato. In: **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. (orgs). São Paulo: Ed. Atheneu. p. 229 – 250, 2009.

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

FANTONI, D.T; CORTOPASSI, S.R.G.; BERNARDI, M.M. Anestésicos Intravenosos e Outros Parenterais. In: SPINOSA, H.S. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

FDA - Food and Drug Administration. **Guideline for Industry**. Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products. 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm074950.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2019.

FLEMING H.P., WALTER W.H.J., ETCHELLS J.L. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. **Appl. Microbiol**.,26: 777-782. 1973.

GOURAMA H., LETUTOUR B., TANTAOUI ELARAKI, A., BENBYA M., BULLERMAN L.B. Effects of oleuropein, tyrosol and caffeic acid on the growth of mold isolated from olives. J. **Food Protect**., 52: 264-266. 1989.

HAYES, J. E., ALLEN, P., BRUNTON, N., O’GRADY, M. N., & KERRY, J. P. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: olive leaf extract (Olea europaea L.), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 948-955, 2011.

HUSSAIN, A. I. et al. Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two Origanum species growing in Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 943-952, 2011.

JUVEN, B., HENIS, Y. Studies on antimicrobial activity of olive phenolic compounds. **J. Appl. Bacteriol**., 33: 721-732, 1970.

KORUKLUOGLU M., SAHAN Y., YIGIT A., TUMAY OZER E., GUCER S. In vitro antibacterial activity of olive leaf (Olea europaea L.) extracts and their chemical characterization. KusadasI-Aydin, **4th Aegean Analytical Chemistry Days**, Turkey. 2004.

LAPPONI, J.C. Estatística Usando Excel. São Paulo: **Lapponi Treinamento e Editora**, 2000. 451p.

LEE, O. H. et al. Assessment of phenolic-enriched extract and fraction of olive leaves and their antioxidante activities. **Bioresour. Technol**., v. 100, n. 23, p. 6107-6113, 2009.

LEMONICA, I. P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M. T. V.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Manual de teratogênese**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2001.

MCDONALD S., PRENZLER P.D., ANTOLOVICH M., ROBARDS K.Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chem.,** 73: 73-84. 2001.

MARKIN, D., DUEK, L., BERDICEVSKY, I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. **Mycoses**, v. 46, n. 3-4, p. 132-136, 2003.

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DE AZEITES DE OLIVA E DE FOLHAS DE OLIVEIRA PROVENIENTES DE CULTIVARES DO RS, BRASIL. **Brazilian Journal of Food & Nutrition**/Alimentos e Nutrição, v. 23, n. 4, 2012.

MELLO, M.S.C. Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos.131f.**Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro/RJ, 2007.

MICOL V., CATURLA N., PÈREZ-FONS L., MÁS V., PÈREZ ESTEPA A. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). **Antiviral Res**., 66: 129-136. 2005.

MONDELLO, F.; BERNARDIS, A.; GIROLAMO, A. et. al. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infect Dis**., v.6, p. 158, 2006.

OECD/OCDE. OECD **Guideline for the Testing of Chemicals**. 2001. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl414.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2019.

OOTANI, Marcio A. et al. Use of essential oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

OLIVEIRA, A. F. et al. Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 117-125, 2003.

PEIXOTO, E. R. M.; SANTANA, D. M. N.; ABRANTES, S. Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva: Proposta para atualização da legislação brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 444-452,1998.

PEREIRA, F. O. Atividade antifúngica do óleo essencial de Cymbopogon winterianus Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero trichophyton. 119f. **Dissertação Mestrado em Veterinária), Universidade Federal de Pernambuco**, João Pessoa, 2009.

SANTIN, R. Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae. 2013. **Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,** Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS.

SILVA D.T. et al. Esporotricose conjuntival felina. Acta Scientiae Veterinariae; 36 (2): 181-184. 2008.

SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência & desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v.16, p. 38-43. 2000.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000. 891p..

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

SILVA, S., GOMES, L., LEITAO, F., COELHO, A. V., & BOAS, L. V. Phenolic compounds and antioxidante activity of Olea europaea L. fruits and leaves. **Food Sci. Technol**. Int., v. 12, n. 5, p. 385-396, 2006.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p.449-484, 2004.

TASSOU C.C., NYCHAS G.J.E. (1995). Inhibition of Salmonella enteriditis by oleuropein in growth broth and in a model food system. **Lett. Appl. Microbiol**., 20: 120-124. 1996.

TUCK K.L., HAYBALL P.J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. **J. Nutr. Biochem**., 13: 636-644. 2002.

WHO. **Organizatión Mundial de la Salud Ginebra**. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. 2005.

VEIGA JR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de farmacologia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. Summa Phytopathol, v. 37, n.1, p. 18-23, 2011.

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