

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Toxicidade aguda, subcrônica e reprodutiva do extrato etanólico da casca do caule da *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae) em roedores

Melka Coêlho Sá

TERESINA

2012

MELKA COÊLHO SÁ

Toxicidade aguda, subcrônica e reprodutiva do extrato etanólico da casca do caule da *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae) em roedores

Relatório de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia de Produtos Naturais do Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Amilton Paulo Raposo Costa

TERESINA

2012

Toxicidade aguda, subcrônica e reprodutiva do extrato etanólico da casca do caule da *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae) em roedores

Esta dissertação foi apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia de Produtos Naturais do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Amilton Paulo Raposo Costa

Data da aprovação : ____ de _____ de 2012

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa
(Orientador)
Universidade Federal do Piauí**

**Profa. Dra. Silvéria Regina de Sousa Lira
(Membro externo)
Associação de Ensino Superior do Piauí**

**Profa. Dra. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva
(Membro interno)
Universidade Federal do Piauí**

“Aceita as surpresas que transformam teus planos, derrubam teus sonhos, dão rumo totalmente diverso ao teu dia e, quem sabe, à tua vida. Não há acaso. Dá liberdade ao Pai, para que Ele mesmo conduza a trama dos teus dias.”

Dom Hélder Câmara

DEDICATÓRIA

Com todo carinho e amor, que construí em resposta ao amor e dedicação dos meus pais e familiares, dedico este fruto de esforço e renúncias a Deus. Mas não ao Deus invisível, mas sim ao Deus que faz morada em nosso corpo, este que nos faz únicos e especiais:

Anamasté!

“O Deus que está em mim saúda o Deus que está em você”

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por nunca ter desistido desta pobre pecadora e sonhar os sonhos mais lindos para mim;

Ao prof. Amilton pela orientação, disponibilidade e alegrias compartilhadas;

Ao prof. Paulo Humberto pelos conselhos e por ter fornecido o material vegetal para estudo;

A todos professores, funcionários e alunos do NPPM em especial a: Carla, Joelma, Joseana, George, Flavia, Francilene, Patrick, Renata, Halmilsson e José Ribamar pelo apoio e carinho;

A querida profa. Silvana Maria quem me apresentou, com olhos de paixão, o fantástico mundo da pesquisa em patologia;

Aos amigos médicos veterinários: Paulo Alex, Vicente, Marinna, Lauro, Flavio, Francisco Leite, Ciro, Luciano, Dayane, que acolheram uma 'estranha' no ninho, em especial a minha "chefa" Janylla Mirck que pacientemente dedicou-se a este trabalho;

A galera que dividia bancada e viagens comigo: Leopoldo, Marina, Tatiane, Indira, Cristian, Denise, Emanuelle, Bispo;

Ao Prof. Gregorio, prof. Francisco Assis e a profa. Priante pelos conhecimentos compartilhados;

A minha melhor aquisição de 2010, Joseana Leitão, sem dúvida a amizade e cumplicidade construída durante esses poucos anos me fez próxima de sua vida e me fez vencer grandes desafios;

Aos funcionários Davi, Bras, Silvéria, seu Fernando e Dona Fátima obrigada pelo estímulo constante, risadas trocadas e cooperação;

A todos alunos e professores do Laboratório de Produtos Naturais/UFPI em especial a profa. Mariana e ao amigo Everton;

A minha querida Timon, cidade de onde foi tirada as amostras deste estudo e onde por quase 6 anos orgulhosamente fui dentista. Em especial a minha equipe da localidade São Benedito obrigada pelos apoios sinceros e por ser palco do meu crescimento profissional e humano;

Aos meus eternos alunos: Angela, Allysson, Solene e Nelma;

Agora é a parte que se fala e por último..mas não menos importante, a minha família. Agradeço a minha grande e pequena família. A minha grande família que é a Pastoral da Juventude, ao meu best Bispo Dom Juarez, ao meu Best Pe Luis Eduardo, ao Pe Tony, ao meu grupo MANÁ (Meu Amor Nunca Acabará), a arquidiocese de Teresina, a PJ Leste e a PJ de Fátima pela cumplicidade;

A minha amiga-irmã Ana Patrícia pelo verdadeiro estímulo a pesquisa;

A minha prima-irmã Anna Barbara por me amar e me acolher sempre;

Aos primos-irmãos Almir Neto, Lucas e Goethe por me aturar e por encher minha casa de alegria;

A galera da engenharia que fazem de minha casa um salão de festa e insistem em não deixar eu dormir, mesmo quando tinha que acordar cedo para executar protocolos no CCA;

As minhas madrinhas Karla e Mercedes por rezarem por mim e por sempre abençoarem meus passos;

Aos meus familiares os Coelhoos, os Sás e os Lobatos obrigada pelo exemplo constante;

A minha pequena família: papai, João Sá; mamãe, Concita; minha irmã mestre Rafaella; meu irmão Joãozinho; a sobrinha Ava (avassaladora) e a minha dama de companhia Edina obrigada pelo amor, dedicação e compreensão mesmo na incompreensão;

E como não podia faltar; a todos que ajudaram direta e indiretamente na construção deste trabalho. Meu muito Obrigada e que Jesus cubra de misericórdia suas vidas.

Toxicidade aguda, subcrônica e reprodutiva do extrato etanólico da casca do caule da *Terminalia fagifolia* Mart & Zucc (Combretaceae) em roedores

Dissertação de mestrado, SÁ, M.C.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
NPPM/CCS/UFPI, 2012

RESUMO

Terminalia fagifolia Mart. & Zucc. (capitão-do-campo, chapadeiro, cachaporra-dogentio) é uma planta típica do cerrado brasileiro, cuja a casca do caule é utilizada pela medicina popular para alívio de desconfortos gastrointestinais, o estudo fotoquímico da casca mostrou a presença de grande quantidade de substâncias antioxidantes (triterpenos e flavonoides) que são responsáveis pelo efeito farmacológico e podem desenvolver efeito tóxico principalmente no sistema reprodutivo. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial tóxico: agudo, subcrônico e reprodutivo do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia Fagifolia* Mart. & Zucc., em roedores. Para teste de toxicidade aguda, cinco grupos de camundongos fêmeas foram tratados por via oral com extrato etanólico ou fração (hidroalcoólica, hexânica ou aquosa) por gavagem 2,0 g/kg/dia (n= 5/grupo), o comportamento geral e mortalidade foram observados por até 14 dias. Para o ensaio de toxicidade subcrônica, ratas Wistar receberam o extrato etanólico ou fração (hidroalcoólica ou aquosa) por gavagem nas doses de 80, 240 ou 720 mg/kg/dia (n= 6/grupo) por 30 dias, durante os quais foi feita a avaliação do ciclo estral por citologia vaginal. Ao final desse período os parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, fosfatase alcalina, AST e ALT) e morfológicos foram determinados. Para o estudo de toxicidade gestacional quatro grupos ratas prenhes (n= 6-8 por grupo) foram tratados com, extrato ou fração, por via oral do 1º ao 19º dia de gestação, nas doses de: 0, 80, 240 e 720 mg/kg. No 20º dia de gestação, os animais foram eutanaziados e laparotomizadas para avaliar parâmetros reprodutivos. O número de mortes após o tratamento agudo resultou na estimativa de dose letal acima de 2 g/kg e abaixo de 5g/kg para extrato etanólico e frações. O tratamento subcrônico com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. e frações não alterou o ganho de peso, consumo de ração e água, ocorrência de estros, intervalos entre estros e perfis bioquímicos. Além disso, não provocou mudanças no aspecto macroscópico e microscópico dos órgãos dos animais. No ensaio de toxicidade gestacional não houve diferença entre os grupos controle e tratados quanto ao número de fetos vivos e mortos, peso das placentas e dos ovários, número de locais de implantação, número de sítios de reabsorção, número de corpos lúteos nos ovários, nem quanto as taxas de perda pré e pós-implantação. No ensaio de avaliação da toxicidade subcrônica sistêmica e reprodutiva em ratos Wistar tratados com EETF, não foram observadas alterações nos órgãos reprodutivos avaliados. Por conseguinte, conclui-se que o extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae) e suas frações não apresentam efeito tóxico agudo ou subcrônico sistêmico ou reprodutivo em camundongos e ratos machos ou fêmeas.

Palavras chave: Combretaceae, *Terminalia*, toxicidade.

Acute toxicity, subchronic and reproductive ethanolic extract of stem bark of *Terminalia fagifolia* Mart & Zucc (Combretaceae) in rodents

Master's Thesis, SÁ, M.C.
Post-Graduate Program in Pharmacology
NPPM/CCS/UFPI, 2012

ABSTRACT

Terminalia fagifolia Mart. & Zucc. (field-captain, chapadeiro, cachaporra-of-Gentile) is a plant typical of the Brazilian savanna, whose stem bark is used in popular medicine for relief of gastrointestinal discomfort, the study of stem bark by photochemical methods showed the presence of large amounts of antioxidants (flavonoids and triterpenes) that are responsible for the pharmacological effect and may develop toxic effect mainly in the reproductive system. The objective of this study was to investigate the toxic potential of ethanol extract using protocols acute, subchronic and directed to the reproductive system in rodents. For acute toxicity test, groups of five female mice were orally treated ethanolic extract or fraction (hydroalcoholic, hexanic or aqueous) by gavage 2.0 g / kg / day (n = 5/grupo), the general behavior and mortality were observed for up to 14 days. For the subacute toxicity test, Wistar rats received the ethanol extract or fraction (hydroalcoholic, hexanic or aqueous) by gavage at doses of 80, 240 or 720 mg / kg / day (n = 6/group/sex) for 30 days, during which the estrous cycle was evaluated by vaginal cytology. At the end of this period, biochemical parameters (urea, creatinine, AST and ALT) and morphology were determined. For the toxicity study in pregnant, four groups of pregnant rats (n = 6-8 per group) were treated with extract or a fraction orally from the 1st to 19th day of gestation at doses of 0, 80, 240 and 720 mg / kg. On the 20th day of gestation, the animals were killed and laparotomized to assess reproductive parameters. The number of deaths after acute treatment resulted in the estimated lethal dose above 2 g / kg and below 5g/kg to ethanolic extract and fractions. Subacute treatment with ethanolic extract of stem bark of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (EETF) and fractions did not affect weight gain, water and food intake, the occurrence of estrus, the interval between two estrus and biochemical profiles. Also, did not cause changes in the macroscopic and microscopic organs of animals. Toxicity test in pregnancy, not show statistical significance between control and treated groups in the number of live fetuses, dead fetuses, weight of placenta and ovaries, number of implantation sites, number of resorption sites, number of corpora lutea, or concerning loss rates before and after deployment. In the evaluating the subchronic and reproductive toxicity in male Wistar rats treated with EETF, no changes were observed in the reproductive organs or the other evaluated. Therefore concludes that the ethanolic extract of stem bark of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae) and their fractions do not exhibit acute or subchronic toxic effect systemic or reproductive in mice and male or female rats.

Key words: Combretaceae, *Terminalia*, toxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT- Alanina aminotransferase

AST - Aspartato transaminase

CCA- Centro de Ciências Agrárias

CCl₄ - Tetracloreto de carbono

CEEAA/UFPI – Comitê de Ética em Pesquisa Experimental da Universidade Federal do Piauí

dL- Decilitro

DL₅₀ - Dose letal mediana

EETF - Extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc

FAq-EETF - Fração aquosa do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

FHA-EETF - Fração hidroalcoólica do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

FHEX-EETF - Fração hexânica do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

g - grama

h - hora

H₂O/MeOH - Solução água e metanol

kg - Quilograma

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

MeOH/ H₂O- Solução metanol e água

MMP-2 - Metaloproteína de matriz-2

mL - Mililitro

mg - Miligrama

nº - número

NaCl - Cloreto de sódio

NPPM- Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais

PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SUS - Sistema Único de Saúde

TEPB - Herbário Graziela Barroso

UFPI - Universidade Federal do Piauí

μL- Microlitro

μm- Micrometro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** **A**, Mapa do Brasil com destaque para as áreas de cerrado (ALMEIDA et al.,1998) e **B**, mapa do Piauí mostrando a distribuição da vegetação de cerrado e de transição (CEPRO,1992) 20
- Figura 2-** As 25 áreas de *hotspots* segundo Myers (1988) 21
- Figura 3** – Detalhes da folha, fruto e casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. 22
- Figura 4-** Substâncias isoladas do extrato etanólico da madeira * e das cascas do caule # de *Terminalia fagifolia* (GARCEZ et al, 2006) 25
- Figura 5-** Esquema da obtenção do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* (EETF) e de sua partição em fração aquosa (FAq-EETF), fração hidroalcolica (FHA-EETF) e fração hexanica (FHEX-EETF). 34
- Figura 6** - Ganho de peso de camundongos Swiss (fêmeas) por 14 dias após tratamento agudo com extrato etanólico (EETF), fração hidroalcolica (FHA-EETF), fração aquosa (FAq-EETF) ou fração hexanica (FHEX-EETF) da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. 41
- Figura 7-** Ganho de peso de ratas Wistar após 30 dias de tratamento com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. 42
- Figura 8-** Ganho de peso de ratas Wistar após 30 dias de tratamento com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. 43
- Figura 9** - Intervalo entre estros (A) e número de estros (B) em ratas Wistar submetidas aos tratamentos com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. durante 30 dias 44
- Figura 10** - Intervalos entre estros (A) e número de estros (B) em ratas Wistar submetidas aos tratamentos com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. durante 30 dias 45
- Figura 11-** Ganho de peso de ratas Wistar prenhes nos 20 dias de tratamento com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. 48
- Figura 12-** Médias, \bar{x} , e medianas, \tilde{x} , dos parâmetros reprodutivos avaliados em ratas Wistar prenhes tratadas, durante 20 dias, com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. 49
- Figura 13-** Ganho de peso de ratos Wistar após 30 dias de tratamento com água destilada (veículo) ou com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Massa e rendimento do extrato etanólico das casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> (EETF) e de sua partição em fração aquosa (FAq-EETF), fração hidroalcolica (FHA-EETF) e fração hexanica (FHEX-EETF)	34
Tabela 2- Mortalidade de camundongos Swiss (fêmeas) após tratamento agudo, até 14 dias, com extrato etanólico (EETF), fração hidroalcolica (FHA-EETF), fração aquosa (FAq-EETF) ou fração hexanica (FHEX-EETF) da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc.	40
Tabela 3- Consumo diário de água e ração (média±epm) de camundongos Swiss (fêmeas) durante 14 dias, após tratamento agudo com extrato etanólico (EETF), fração hidroalcolica (FHA-EETF), fração aquosa (FAq-EETF) ou fração hexanica (FHEX-EETF) da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc.	41
Tabela 4- Consumo diário de ração e água por ratas Wistar tratadas durante 30 dias com extrato etanólico da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc. (EETF)	43
Tabela 5- Consumo diário de ração e água (média±epm) de ratas Wistar tratadas durante 30 dias com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc.	44
Tabela 6- Número médio de folículos ovarianos de ratas Wistar submetidas aos tratamentos com extrato etanólico da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc. durante 30 dias	45
Tabela 7- Número médio de folículos ovarianos de ratas Wistar submetidas aos tratamentos com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc. durante 30 dias	46
Tabela 8- Massa relativa (mg/100g de peso corporal) dos órgãos de ratas Wistar submetidas aos tratamentos com extrato etanólico da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc. durante 30 dias	46
Tabela 9- Massa relativa (mg/100g de peso corporal) dos órgãos de ratas Wistar submetidas aos tratamentos com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc. durante 30 dias	47
Tabela 10- Parâmetros bioquímicos avaliados em ratas Wistar submetidas aos tratamentos com extrato etanólico da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc. durante 30 dias	47
Tabela 11- Parâmetros bioquímicos avaliados em ratas Wistar submetidas aos tratamentos com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc. durante 30 dias	48
Tabela 12- Valores médios dos parâmetros reprodutivos avaliados em ratas Wistar prenhes tratadas, durante 20 dias, com extrato etanólico da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc.	49
Tabela 13- Valores médios dos parâmetros reprodutivos avaliados em ratas Wistar prenhes tratadas, durante 20 dias, com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc.	50

- Tabela 14-** Massa relativa (mg/100g de peso corporal) dos órgãos de ratas Wistar prenhes submetidas ao tratamento, durante 20 dias, com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc. 50
- Tabela 15-** Massa relativa de órgãos avaliados de ratas Wistar prenhes tratadas, durante 20 dias, com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc. 51
- Tabela 16-** Consumo diário de ração e água de ratos Wistar tratadas durante 30 dias com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc..(EETF) 52
- Tabela 17-** Massa relativa (mg/100g de peso corporal) dos órgãos de ratos Wistar submetidos ao tratamento, durante 30 dias, com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc. (EETF) 52
- Tabela 18-** Massa relativa (mg/100g de peso corporal) dos órgãos de ratos Wistar submetidos ao tratamento, durante 30 dias, com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc. (EETF) 53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Plantas do Cerrado e pesquisa de novos fármacos	20
2.1.1 <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. & Zucc.	23
2.2 Flavonóides	26
2.3 Desreguladores endócrinos	26
2.4 Parâmetros indicativos de toxicidade	28
3 OBJETIVOS	
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Material Vegetal	33
4.2 Obtenção e partição do extrato etanólico da casca do caule de <i>Terminalia fagifolia</i> (EETF)	33
4.3 Animais	35
4.4 Protocolos Experimentais	35
4.4.1 Potencial toxicológico agudo do EETF e frações em camundongos	36
4.4.2 Potencial toxicológico subcrônico e toxicidade reprodutiva em ratas Wistar fêmeas tratadas com diferentes doses de EETF e frações	36
4.4.3 Efeito do tratamento com extrato EETF e frações em diferentes doses sobre a gestação e a prole	37
4.4.4 Avaliação da toxicidade sub-crônica e toxicidade reprodutiva em ratos Wistar machos tratados com diferentes dose de EETF	38
4.5 Análise estatística	39
5.1 Toxicidade aguda de EETF e frações em camundongos	40
5.2 Efeitos do tratamento subcrônico com EETF ou frações em ratas Wistar fêmeas	42
5.3 Parâmetros de toxicidade reprodutiva em ratas Wistar fêmeas prenhes	48

5.4 Efeitos do tratamento subcrônico com EETF em ratos Wistar machos	51
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO	69

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande variedade de biomas, que abrigam várias espécies com elevado potencial terapêutico. Sem dúvida, um dos grandes legados da miscigenação da população brasileira é o conhecimento sobre a utilização de plantas para cura e alívio de patologias. A investigação do potencial terapêutico de uma planta necessariamente passa por um estudo etnofarmacológico, farmacológico e toxicológico (OECD's, 2001).

A fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. Considerando a produção e a crescente comercialização de fitoterápicos como atividade de grande importância econômica e social, faz-se necessário a implantação de políticas que incentivem o cultivo e o beneficiamento de matérias-primas vegetais, bem como o desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, pois dessa forma além de contribuir para o surgimento de um setor produtivo, o arsenal terapêutico seria aumentado por produtos com eficácia e segurança comprovadas (BENINI et al, 2010).

O maior potencial econômico da bio-diversidade está associado à descoberta de novas drogas derivadas diretamente ou sintetizadas a partir de recursos biológicos, principalmente plantas medicinais associadas ao conhecimento tradicional. Assim, a competência de um país para desenvolver atividades de bioprospecção está intimamente relacionada com a própria capacidade que este país tem para o desenvolvimento de drogas terapêuticas a partir de plantas medicinais. Os fitoterápicos constituem importante fonte de inovação em saúde, visto que 25 a 30% das drogas disponíveis no mercado derivam diretamente de produtos naturais sendo, assim, objeto de interesses empresariais privados (FERREIRA; COSTA, NUNEZ, 2011).

Reputando a importância, a abrangência e reconhecendo que os fitoterápicos são uma alternativa terapêutica eficiente, o Ministério da Saúde, por meio da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, colocou em discussão a Política Nacional de Plantas Medicinais e Assistência Farmacêutica. Esta iniciativa, desencadeada pelo Ministério da Saúde em

2001, teve por objetivo a utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2001). Em junho de 2006 foi instituindo a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), uma política ampla que tem como eixos prioritários: o acesso a plantas medicinais e fitoterápicos, incentivo à pesquisa, o uso racional e seguro dos produtos, o desenvolvimento da cadeia produtiva; o fortalecimento da indústria nacional e o reconhecimento do uso tradicional dos mesmos. A implantação desta estratégia nos municípios é incentivada por portarias ministeriais, que estabelecem a inclusão do farmacêutico como o profissional que deverá estabelecer inter-relação e uma prática destacada para o emprego das plantas medicinais, medicamentos fitoterápicos e homeopáticos (BRASIL, 2008).

Para que um fitoterápico seja utilizado, este deve ser isento de efeitos colaterais e tóxicos. Assim sendo, fazem-se necessários estudos de toxicidade, como exigido pela RDC n° 48 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e RE n° 90 que traz o guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, ambas de 16 de março de 2004 (BRASIL^{a,b}, 2004).

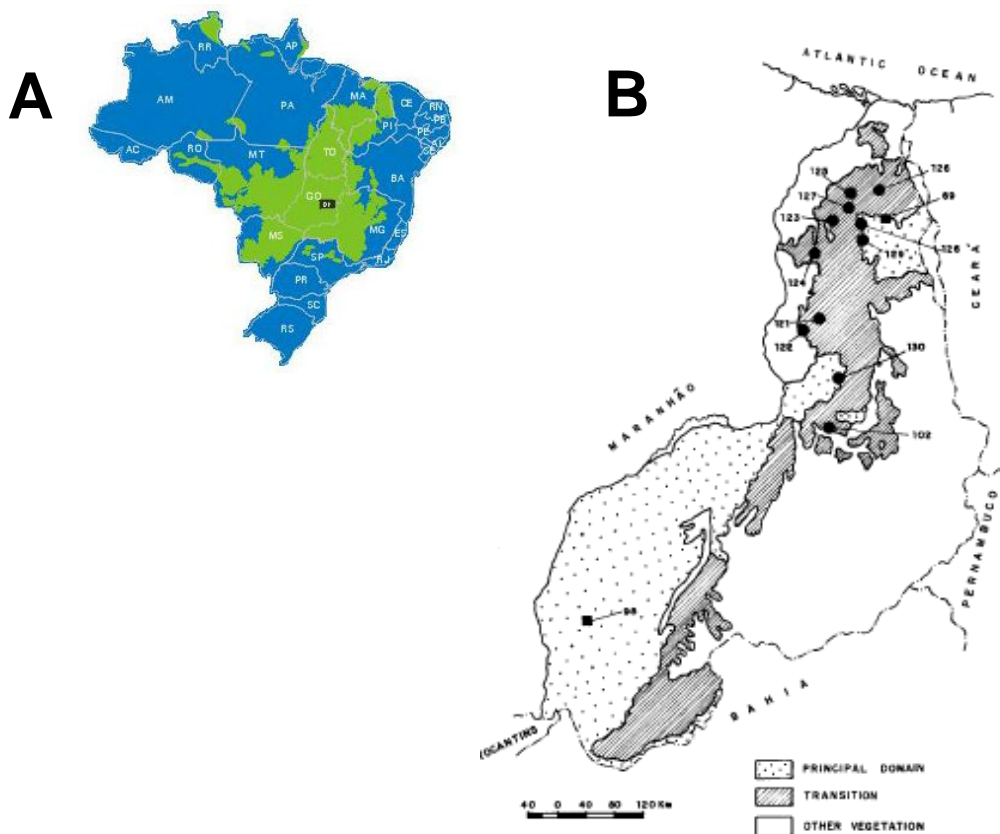
Integrando conhecimentos com as diversas ciências; botânica, química, biotecnologia e farmacologia, o Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da UFPI, NPPM, vem desenvolvendo estudos com extratos de plantas nativas do cerrado piauiense com interesse do desenvolvimento de fitoterápicos. Neste contexto o presente trabalho teve como objeto de estudo a investigação da toxicidade do extrato etanólico obtido da casca do caule da *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc., planta amplamente utilizada na medicina popular piauiense e maranhense para tratamento de diversas enfermidades .

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas do Cerrado e pesquisa de novos fármacos

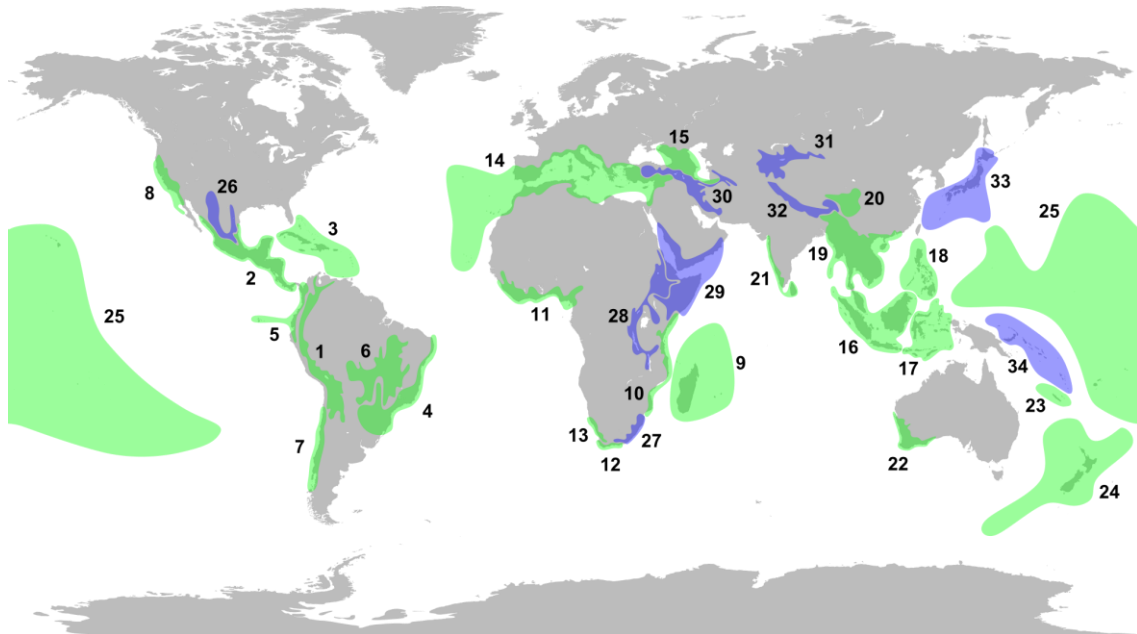
O cerrado, Figura 1, é o segundo maior bioma brasileiro ocupando aproximadamente 22-23% do território nacional e concentrando um terço da biodiversidade nacional e 5% da flora e fauna mundial (LINDOSO et. al., 2009).

Figura 1- **A**, Mapa do Brasil com destaque para as áreas de cerrado (ALMEIDA et al.,1998) e **B**, mapa do Piauí mostrando a distribuição da vegetação de cerrado e de transição (CEPRO,1992)



Este bioma sofre com a devastação em decorrência das carvoarias, do desmatamento e das culturas de milho, algodão, arroz e soja, o que provoca reflexos na flora e fauna, fatos que levam o cerrado a ser considerado um dos biomas mais ameaçados de extinção do mundo. Por abrigar grande quantidade de espécies endêmicas de grande importância para a biodiversidade do mundo e estar sofrendo devastação, o cerrado brasileiro é considerado um *hotspots*, Figura 2 (Myers,1988).

Figura 2- As 25 áreas de *hotspots* segundo Myers (1988)



A baixa média pluvial promove características morfológicas específicas na flora do cerrado, como a presença de xilópódios e cascas que acumulam reservas. O potencial medicinal do cerrado é conhecido historicamente por populações indígenas, colonizadores portugueses, escravos africanos e pela sociedade sertaneja, os quais têm seus conhecimentos passados de geração a geração. Esta conjunção conhecimento e biodiversidade, estabelece um bom cenário para o desenvolvimento de pesquisas que visam a descoberta de novos fármacos a partir de espécies nativas (FERREIRA; CASTRO, NUNEZ, 2011).

As famílias Vochysiaceae, Fabaceae e Combretaceae estão entre as 59 famílias já identificadas no domínio cerrado. A família Combretaceae compreende 18 gêneros, sendo *Combretum* e *Terminalia* os mais abundantes, com cerca de 370 e 200 espécies, respectivamente (ALMEIDA et al., 1998).

A espécie *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Figura 3), conhecida popularmente como capitão, capitão-do-campo, chapadeiro, cachaporra-dogentio e pau-de-bicho, é uma árvore do cerrado, considerada como ornamental em meio urbano (LORENZI,2002). Sua madeira é empregada na carpintaria e seus frutos são utilizados no artesanato (CORREA, 1978). Esta espécie encontra-se distribuída em nosso país no Planalto Central, Pantanal Mato-

grossense, Baixo Parnaíba e ainda nas regiões da caatinga do Vale do São Francisco e do norte de Minas Gerais a Pernambuco (ALMEIDA et al, 1998; CASTRO; MARTINS, FERNADES, 1998).

A casca do caule da *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. é amplamente utilizada pela população do cerrado brasileiro para o combate de males intestinais (má digestão, constipação e azia), tratamento de tumores e combate a inflamação (ROCHA-COELHO; SANTOS, 2008). Estudos em andamento apontam atividade gastroprotetora do extrato etanólico da casca do caule desta espécie, atividade que é justificada pela elevada presença de compostos antioxidantes (triterpenos e flavonoides) próprios das plantas do gênero *Terminalia* (GARCEZ et al., 2006; SOUSA et al., 2007; AYRES et al., 2009; SILVA; MIRANDA, CONCEIÇÃO, 2010).

Figura 3 – Detalhes da folha, fruto e da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.



FONTE: www.freeimagefinder.com/terminalia/; <http://www.flickr.com/photos/cerrados/5382351372/>

Várias espécies de *Terminalia* e seus compostos isolados têm sido alvo de pesquisas para diversas atividades farmacológicas. Estudos realizados por Manna, Sinha; Sil (2006) demonstraram que o extrato aquoso de *Terminalia arjuna* preveniu as alterações do efeito hepatotóxico e nefrotóxico induzidos por tetracloreto de carbono (CCl₄). O extrato metanólico de *Terminalia arjuna* apresentou atividade gastroprotetora em ensaios de úlcera gástrica induzida por diclofenaco sódico em ratos (DEVI et al., 2007).

A *Terminalia chebula* é utilizada na medicina ayurvédica por suas propriedades adstringente, anti-helmíntica, expectorante, laxativa, dentre outras (PFUNDSTEIN et al., 2010).

O pré-tratamento de ratos Wistar com *Terminalia chebula* Gertn reduziu a produção de ácido nitrilotriacético férrico, indutor do estresse oxidativo e tumorigênese renal (PRASAD et al., 2007) e promoveu hepatoproteção no modelo de toxicidade induzida por rifampicina, pirazinamida e isoniazida em ratos (TASDUQ et al., 2006). Estudos *in vitro* utilizando diferentes concentrações de extratos e frações desta espécie mostrou uma redução da concentração de citocromo P450 no fígado de ratos, revelando atividade anti-apoptótica (PONNUSANKAR et al., 2011) e promoveu ainda a proliferação e ativação da metaloproteinase da matriz-2 (MMP-2) em fibroblastos, atividade justificada pelas propriedades antioxidantes do extrato (MANOSROI et al., 2010). Estudos realizados por Srivastav et al. (2010) avaliando o efeito antireprodutivo, da administração oral do extrato de *Terminalia chebula*, 100 mg/kg durante 60 dias, demonstrou uma potente atividade antiespermatogênica e uma acentuada redução da fertilidade em ratos submetidos ao tratamento.

Pesquisas em andamento no NPPM apontam para importantes propriedades terapêuticas do extrato da casca do caule de *Terminalia fagifolia*, Mart. & Zucc. tais como atividade antiulcerogênica, espamolítica e gastroprotetora em ratos. Entretanto não foram encontrados relatos na literatura a respeito de efeitos tóxicos, assim este trabalho é um estudo pioneiro que visa avaliar a toxicidade aguda e crônica do extrato da casca do caule de *Terminalia fagifolia*, inclusive sobre os aspectos reprodutivos, contribuindo desta forma para uma utilização mais segura da planta pela população e para o desenvolvimento de estudos da espécie.

2.1.1 *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

Em geral, os efeitos farmacológicos de produtos naturais são atribuídos aos metabólitos secundários que são produzidos pela planta para proteção contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Essas substâncias podem ser tóxicas em humano e provocar carcinogênese, toxicidade hepática,

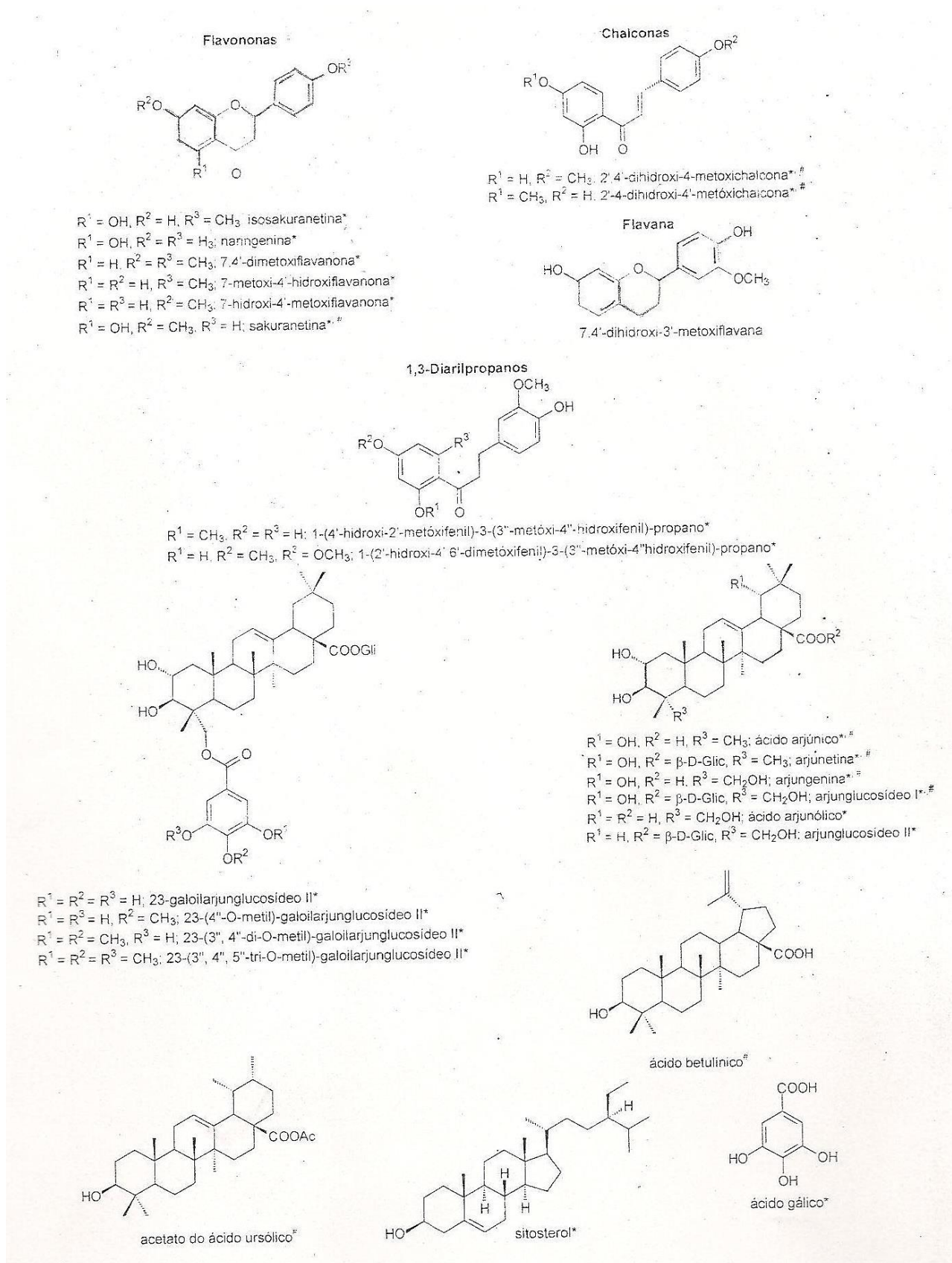
neurológica e renal, pois muitas ainda não foram objeto de investigação científica (ALÍA et al, 2003).

Ayres et al. (2009) realizou o estudo fitoquímico do teor de fenóis totais e a avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc, o fracionamento da fase hidroalcoólica do extrato etanólico resultou no isolamento e identificação da (+)-catequina e 3-O- β -D-glicopiranosídeo do sitosterol, identificado como seu derivado acetilado, além de uma mistura de flavonóides glicosilados de difícil separação. O fracionamento do material solúvel em MeOH de *T. fagifolia* possibilitou a identificação de dois tocoferóis (α e β) da mistura de lupeol, α - e β -amirina e do sitosterol, estes compostos foram caracterizados por RMN ¹H e ¹³C e dicroísmo circular. O extratos etanólico e frações apresentaram alto teor de fenóis totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu podendo explicar em parte a excelente atividade antioxidante, avaliada pelo método do DPPH, a presença da (+)-catequina contribuem significativamente para o potencial antioxidante da *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

Da madeira e das cascas do caule de *Terminalia fagifolia* foram isolados dois 1,3-diarilpropanos, sete flavanonas, duas chalconas, uma flavana, e nove triterpenos pentacíclicos, além de ácido gálico e sitosterol. Os diarilpropanos representam os primeiros membros desta classe em Combretaceae e as flavanonas e chalconas estão sendo descritas pela primeira vez na família. As substâncias isoladas foram avaliadas quanto às atividades citotóxica *in vitro* (células Hep2 e H292, carcinomas de laringe e mucoepidermóide de pulmão humanos, respectivamente) e antioxidante. As chalconas, o diarilpropano 1-(2'-hidróxi-4',6'-dimetóxiifenil)-3-(3"-metóxi-4"-hidróxiifenil) -propano e os derivados di- e tri-metilados de 23-galoilarjungalucosídeo foram os mais ativos quanto à atividade citotóxica (GARCEZ et al, 2006).

Os estudos de Ayres et al. (2009) e de Garcez et al (2006) determinaram que os compostos flavonoidicos, Figura 4, são predominante no gênero *Terminalia* e substâncias essas que justificam a atividade antioxidante.

Figura 4- Substâncias isoladas do extrato etanólico da madeira * e das cascas do caule # de *Terminalia fagifolia* (GARCEZ et al, 2006).



2.2 Flavonóides

Os compostos flavonoidicos funcionam como agentes de defesa para as plantas e apresentam capacidade redutora. Exibem várias ações farmacológicas como: antiinflamatória, antiagregante plaquetário, antialergênicos, antimicrobiana e antioxidante. Os flavonóides são antioxidantes mais efetivos que as vitaminas E e C, podendo até poupar o consumo destas vitaminas na alimentação humana (DORNAS et al, 2007)

No ciclo oxidativo, os flavonóides seqüestram espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, inibem enzimas e provocam a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL); atuam reduzindo os metais geradores de radicais livres e interagem com as biomembranas, possibilitando a proteção dos ácidos graxos. Estas suas funções se correlacionam com a prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, certos tipos de câncer, envelhecimento e redução de doenças trombóticas (ALÍA et al, 2003)

O desempenho dos antioxidantes naturais, *in vivo*, depende dos tipos de radicais livres formados, onde e como são gerados esses radicais, da análise e métodos para a identificação dos danos e de concentrações ideais de antioxidantes. Portanto, é possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema e desprotetor em outro, ou que até mesmo aumente as lesões induzidas em outros tipos de sistemas. É necessário mais estudos sobre os mecanismos de ação dessas substâncias no organismo, para que os mesmos possam ser utilizados em larga escala nos cosméticos, alimentos e outras aplicações (RAUBERT et al., 2006; MORAIS et al,2009)

A presença desses compostos antioxidantes naturais pode, em parte, justificar as atividades farmacológicas do gênero *Terminalia*, no ententto estes compostos podem desenvolver efeito tóxico (carcinogênese e mutagênese) em sistemas específicos estes efeitos são justificados pelo fato dessas substancias exercerem efeitos de desregulador endócrino (MARTINEZ et. al, 2010).

2.3 Desreguladores endócrinos

O desregulador endócrino, DEs, é uma substância exógena ou uma mistura que altera funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, causa

efeitos adversos à saúde de indivíduos, de seus descendentes e/ou de populações. De acordo com a Comissão Europeia os compostos estrogênicos, potenciais DEs, incluem: hormônios naturais (estradiol, estrona, estriol) liberados no ambiente por animais e humanos; compostos químicos naturais, que incluem toxinas produzidas por plantas (fitoestrogênios) e por alguns fungos; produtos farmacêuticos sintéticos, produzidos intencionalmente para serem hormonalmente ativos (por exemplo, pílulas anticoncepcionais); produtos químicos sintéticos, que incluem os pesticidas e produtos químicos industriais (alquilfenóis, bisfenóis policlorinados-PCBs, dioxinas, entre outros) com seus resíduos (CEC, 2004).

Substâncias químicas com propriedades estrogênicas agindo no sistema endócrino fora do contexto natural são potencialmente indutoras de um efeito adverso (BIANCO et al., 2010).

Acredita-se que a alteração no sistema endócrino causada pelos DEs pode estar associada, à pelo menos, três mecanismos: a simulação da ação de hormônios naturais, como o estrogênio e a testosterona, desencadeando um estímulo falso de modo exagerado ou em tempo inadequado (efeito agonista); o bloqueio dos receptores específicos de determinados hormônios (efeito antagonista) e pela alteração na síntese, transporte, metabolismo e excreção dos hormônios, causando, alteração na concentração de hormônios naturais (CEC, 2004; BILA; DEZOTTI, 2007).

Substâncias derivadas de plantas também podem ser consideradas DEs, como os fitoestrógenos, que incluem também as isoflavonas, e estão presentes em alguns itens alimentares, como a soja, e em cosméticos com componentes ativos de origem vegetal. Uma boa dieta com fitoestrógenos pode ser protetora contra alguns tipos de cânceres, por exemplo, de mama e próstata, e também doenças da pós-menopausa, como a osteoporose; no entanto, devem ser utilizados com cautela durante a gravidez e na infância. Muitos desreguladores endócrinos são conhecidos por agirem como agonistas dos receptores estrogênicos, como o bisfenol A, ou como antagonistas dos receptores androgênicos, como o fungicida dicarboximida (LEMMEN; ARENDS, VANDERSAAG, 2004).

2.4 Parâmetros indicativos de toxicidade

Segundo a Organização Econômica de Cooperação e Desenvolvimento, a toxicidade aguda e crônica de substâncias pode ser avaliadas por modificações comportamentais, variações no consumo alimentar, evolução ponderal, avaliação biométrica dos órgãos e alterações orgânicas visualizáveis macro e microscopicamente (OECD, 1995; OECD, 2001)

A ocorrência de curta duração do ciclo estral e a seqüência bem reconhecida da citologia vaginal em ratas torna-se útil para investigar interferências sobre a função reprodutiva. O ciclo estral é dividido em quatro estágios, que relacionam o tipo de célula predominante no esfregaço vaginal e o nível de hormônios sexuais presente no animal. Leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas remanescentes aparecem no metaestro. Nesta fase inicia-se o aumento da secreção de estrógeno e o primeiro pico de progesterona. O número de células epiteliais nucleadas aumenta durante o proestro, enquanto os leucócitos praticamente desaparecem. Ocorre, então, o pico de secreção de estrógeno e o segundo pico de progesterona na noite desta fase. Durante o estro aparecem basicamente células epiteliais queratinizadas da camada córnea e o nível de estrógeno retorna a seus valores basais. O estágio diestro consiste predominantemente de leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas, sendo marcado pelo final do primeiro pico de progesterona e baixos níveis de estrógeno (ANDREWS et al, 2010).

As determinações hematológicas e bioquímicas sanguíneas são fundamentais para predizer a influência da substância teste sobre a homeostase e o estado das funções hepática e renal (OECD's, 2001).

Dentre as dosagens bioquímicas que permitem avaliação de alterações orgânicas, ressaltam-se as determinações dos níveis séricos de uréia e creatinina, que permitem averiguar danos renais e as dosagens de transaminases, para investigação de lesões hepáticas. A uréia e a creatinina são produtos de metabolismo do nitrogênio presentes no sangue, utilizadas clinicamente na investigação de doença renal. E as transaminases (AST e ALT), quando em níveis elevados no soro sanguíneo, têm sido amplamente

utilizadas como indicativo de hepatotoxicidade ou injúria hepatocelular (CAMPELO et al., 2009).

Os níveis séricos de ALT aumentam quando ocorrem alterações na permeabilidade ou injúria nos hepatócitos. Já a AST é uma isoenzima mitocondrial e não é liberada tão rapidamente quanto a ALT, que é essencialmente citoplasmática. Além disso, a ALT é um indicador mais sensível de hepatotoxicidade aguda do que a AST, pois enquanto a primeira é essencialmente hepática, a segunda também pode ser encontrada em concentrações elevadas em outros órgãos, como rins, pulmões e coração. E a elevação dos níveis plasmáticos de uréia e creatinina fornecem indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou aumento no catabolismo protéico (AL-HABORY et al, 2002).

Dessa maneira, Santos et al. (2010) consideram como parâmetros normais para as medições séricas de uréia (mg/dL): $35,0 \pm 1,31$; creatinina (mg/dL): $0,6 \pm 0,02$; ingestão hídrica $44,67 \pm 4,69$ (mL/dia), massa cardíaca $0,3 \pm 0,01$ ($\text{g}100.\text{g}^{-1}$ peso corporal) e massa hepática $3,20 \pm 0,07$ ($\text{g}100.\text{g}^{-1}$ peso corporal) para ratos Wistar.

A avaliação dos efeitos tóxicos dos compostos químicos na gravidez deve levar em conta o fato de que a gestação é um período marcado por mudanças fisiológicas que aumentam a absorção de drogas, tais como aumento da função renal e diminuição do metabolismo hepática. A exposição materna a agentes químicos, em determinadas fases da gestação, pode resultar em alterações no desenvolvimento do conceito, dependendo de fatores inerentes ao organismo materno, à funcionabilidade placentária ou à ação direta no próprio organismo embriofetal (NAVA; ROMAN, 2006).

Os fatores que afetam a transferência placentária e que podem interferir com o feto estão relacionados a: propriedades físico-químicas do fármaco, velocidade com que atravessa a placenta e alcança o feto; estágio de desenvolvimento placentário e fetal, características da distribuição nos tecidos fetais, mecanismos de eliminação materna e fetal, duração da exposição e efeitos de outras substâncias usadas em associação (BROLIO et al., 2010).

Muitos compostos, incluindo plantas consideradas medicinais, podem interferir nessa travessia da barreira mãe-feto e aumentar ou diminuir risco de teratogenicidade, pois uma única exposição da gestante a um agente teratogênico pode afetar as estruturas que se encontram em rápido desenvolvimento. Nesse período, o efeito de fármacos pode variar em distintos tecidos. Por isso, há necessidade de que sejam realizados estudos de toxicidade, em atenção a essa classe de usuários. Os testes de avaliação de toxicidade reprodutiva compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento (LOURENÇO et al., 2009).

A toxicidade de plantas medicinais é um problema de saúde pública e as pesquisas para avaliação do uso seguro tanto das plantas como dos fitoterápicos ainda são incipientes. Assim a grande diversidade de nossa flora, em especial a do cerrado, e a escassez de informações a respeito dos efeitos tóxicos de várias espécies de plantas tornam este tipo de pesquisa de suma importância para o uso seguro e eficaz das plantas medicinais (VEIGA-JUNIOR; PINTO, MACIEL, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar possíveis efeitos adversos da administração oral do extrato etanólico e frações da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc, analisando parâmetros de toxicidade: aguda, subcrônica e sobre a reprodução em roedores.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Estimar faixa da DL₅₀, identificando a menor dose que cause toxicidade evidente após tratamento agudo com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* e frações em camundongos Swiss albinos;

3.2.2 Determinar os efeitos do tratamento subcrônico com extrato etanólico e frações da casca do caule de *Terminalia fagifolia* sobre o consumo de ração e água e ganho de peso corporal em ratas e ratos Wistar;

3.2.3 Investigar os efeitos do tratamento subcrônico com extrato etanólico e frações da casca do caule de *Terminalia fagifolia* sobre o ciclo estral e morfologia ovariana em ratas Wistar;

3.2.4 Analisar o efeito do tratamento subcrônico com extrato etanólico e frações da casca do caule de *Terminalia fagifolia*, em ratas e ratos Wistar sobre a massa relativa e estrutura microscópica do coração, fígado, rins, estômago e órgãos reprodutivos;

3.2.5 Avaliar possível toxicidade subcrônica em ratas Wistar tratadas com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* e frações, com base nos parâmetros séricos: fosfatase alcalina, ALP, ASP, creatinina e uréia;

3.2.6 Pesquisar o efeito do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* e frações, sobre a performance reprodutiva em ratas Wistar prenhes observando: perdas pré e pós implantação e presença de natimortos, ganho de peso, consumo de ração e de água;

3.2.7 Comparar o peso médio dos recém-nascidos e das placentas em ninhadas de ratas Wistar prenhes, tratadas com veículo, extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* ou frações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

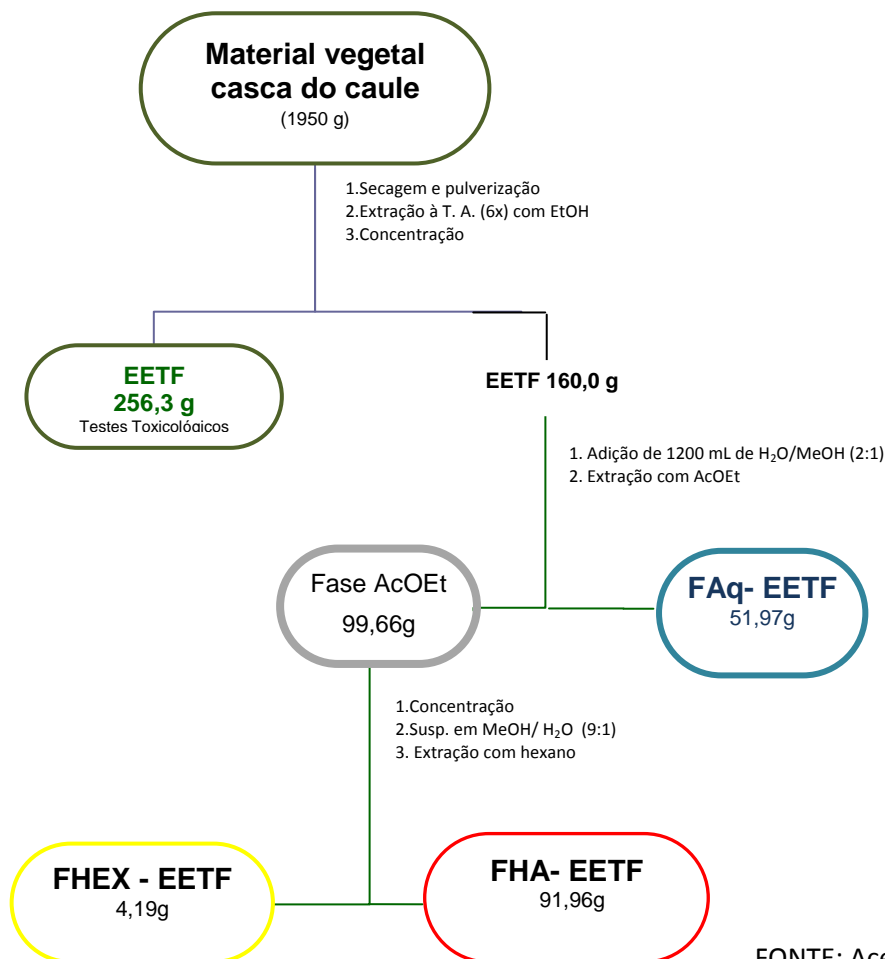
As cascas do caule da *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. foram coletadas em novembro de 2006 na cidade de Timon-MA. A espécie foi identificada pela Dra. Gardene Maria de Souza do Herbário Graziela Barroso – Universidade Federal do Piauí, onde se encontra depositada a exsicata sob o número TEPB – 21691.

4.2 Obtenção e partição do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* (EETF)

As cascas do caule da *T. fagifolia* (1950g), foram secas ao ar, trituradas (moinho de facas da Marconi, São Paulo, Brasil) e submetidas a processo de maceração por seis vezes com etanol PA (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), proporção 1:1 à temperatura ambiente. Após a remoção do solvente em evaporador rotativo (Quimis 344B2, São Paulo, Brasil) a 55°C sob pressão reduzida e liofilização, foi obtido 416,7g do EETF. Uma parte do extrato (256,3g) foi separado para testes de atividade toxicológica e o material restante (160g) foi suspenso em 1200mL de uma mistura de água e metanol (H₂O/MeOH) (2:1), (Qeel São Paulo, Brasil), e submetido à partição com acetato de etila (Merck). A fase orgânica foi concentrada (99,66g), suspensa em MeOH/ H₂O (9:1), (Qeel, São Paulo, Brasil) extraída com hexano, fornecendo assim as fases hidroalcolica (FHA-EETF) 91,96g e hexânica (FHEX-EETF) 4,19g.

O EETF e todas as frações provenientes de sua partição após serem concentradas, foram submetidos a processos de liofilização, dissecação e pesagem, sendo assim obtidas as massas das referidas amostras. A partir desses valores de massas foi possível calcular o teor de extrativos e o rendimento da partição dividindo a massa do extrato ou fração pela massa do material vegetal seco e multiplicado por 100 (Figura 5 e Tabela 1).

Figura 5- Esquema da obtenção do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* (EETF) e de sua partição em fração aquosa (FAq-EETF), fração hidroalcolica (FHA-EETF) e fração hexanica (FHEX-EETF).



FONTE: Acervo pessoal

Tabela 1- Massa e rendimento do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* (EETF) e de sua partição em fração aquosa (FAq-EETF), fração hidroalcolica (FHA-EETF) e fração hexânica (FHEX-EETF).

Extrato / Frações	Massa (g)	Teor de extrativos (%) [*]	Rendimento da partição (%) ^{**}
Extrato EETF	160,0	21,37	100,00
Fase H₂O FAq-EETF	51,98	6,94	32,49
Fase AcOEt	99,66	13,31	62,25
Fase MeOH/H₂O FHA-EETF	91,96	12,28	57,47
Fase Hexânica FHEX-EETF	4,19	0,56	2,62

^{*}Teor de extrativos calculados em relação a 748,74g de casca do caule seca; ^{**} Rendimento calculado em relação a 160,0g de extrato EETF da casca do caule de *T. fagifolia*

Todas as soluções com os extratos foram preparadas imediatamente; antes de cada experimento, utilizando-se água destilada como veículo e acrescentou-se 1% de Tween 80 somente para o preparo da FHEX-EETF. As concentrações de EETF e frações foram ajustadas para o tratamento de modo que fosse aplicado um volume de 10 mL/kg de peso corporal.

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, variedade Swiss) fêmeas adultos (25-35 g) e ratos (*Ratus norvegicus*, linhagem Wistar) machos e fêmeas adultos (90 dias de vida) sabidamente férteis e virgens (180-250 g) provenientes do Biotério de Manutenção de Animais Destinados a Experimentação do Departamento de Morfofisiologia Veterinária-CCA/UFPI (Biomadex). Os animais foram mantidos em gaiolas-padrão para 4-5 animais, em ambiente climatizado (24 ± 1 °C), com ciclo claro-escuro de 12 h e com água e ração (FRI-LAB Ratos – Fri-Ribe) à vontade.

Os protocolos experimentais utilizados estão de acordo com as normas internacionais e foram aprovados pelo Comitê de Ética Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI) com parecer nº 004/11.

4.4 Protocolos Experimentais

4.4.1 Potencial toxicológico agudo do EETF e frações em camundongos

Esse procedimento seguiu a metodologia descrita por Valadares (2006). Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, 25-30 g, mantidos em jejum de sólido durante 18 h. Os animais foram divididos em 6 grupos de 5 fêmeas e tratados, via oral, com o EETF ou frações em dose única de 2 g/kg, no volume de 10mL/kg. Os materiais foram solubilizados em água destilada, sendo que para diluição da FHEX-EETF foi necessário adicionar 1% de Tween 80. Ao grupo veículo, foi ofertado água destilada com 1% de Tween 80. Os parâmetros avaliados até 120 min após a administração e durante 24 h foram: estado de alerta, sedação, ptose, dispnéia, micção, diarreia, convulsão, atividade motora espontânea, reflexo postural, piloereção, resposta ao tato,

morte, dentre outros. O número total de mortos em cada grupo foi quantificado até o final de 14 dias para a estimativa da dose letal média (DL₅₀). O consumo de ração, de água e o ganho dos animais foram avaliados nos 14 dias do experimento.

4.4.2 Potencial toxicológico subcrônico e toxicidade reprodutiva em ratas Wistar tratadas com diferentes doses de EETF e frações.

Ratas Wistar (180-220g), foram divididas em cinco grupos (n=6-8) segundo o tratamento (veículo, extrato ou fração de EETF, hidroalcoólica e aquosa). Todas as ratas foram examinadas diariamente, entre 8:00 e 9:00 horas, quanto à fase do ciclo estral, durante os 30 dias de estudo. A secreção vaginal foi coletada com uma pipeta plástica contendo aproximadamente 10 µL de salina (NaCl a 0,9 %), depositada sobre uma lâmina de vidro para microscopia e analisada por meio de microscopia de luz branca, nas objetivas de 10 e 40x. A ocorrência e a duração do ciclo estral foram utilizadas como parâmetros para análise (MARCONDES; BIANCHI, TANNO, 2002). O tratamento com EETF ou frações foi realizado por via oral, diariamente, durante os 30 dias. A dose de EETF utilizada foi de 3,33; 10 e 30% da DL₅₀ do EETF. Para os grupos tratados com fração do EETF; a dose de 240mg/kg foi escolhida, pois representa aproximadamente 10% da DL₅₀ do EETF. O grupo veículo recebeu, pelo mesmo período, água destilada no volume de 1 mL/100g de peso corporal, mesmo volume utilizado para os extratos ou frações.

Concomitantemente com a avaliação do ciclo estral foram também avaliados os parâmetros: massa corporal (g), consumo diário de ração (g), consumo de água (mL). Ao final dos 30 dias de tratamento, as ratas foram anestesiadas com uma associação de 50 mg de cetamina e 11,5 mg de xilazina por quilograma de peso corporal e o sangue coletado, por meio de punção cardíaca, em tubos de ensaio sem anticoagulante. Em seguida, foram eutanasiadas, por excesso dos mesmos anestésicos, para coleta e avaliação dos órgãos internos: coração, fígado, rins, ovários e útero.

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 3500 rpm por cinco minutos e o soro separado. As determinações bioquímicas foram realizadas por química úmida com kits (Labtest, Belo Horizonte). Foram

avaliados os seguintes parâmetros séricos: fosfatase alcalina, ALP, ASP, uréia, creatinina.

Os órgãos coletados foram pesados, seccionados e fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada. Após 24 horas de fixação as amostras foram submetidas ao processamento histológico composto de desidratação em séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 5,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração com hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio de luz, de acordo com BACHA; WOOD (1990). As secções dos ovários foram usadas para quantificar o número de folículos primários, secundários e maduros (ROOP, DHALIWAL; GURAYA, 2005).

4.4.3 Efeito do tratamento com extrato EETF e sobre a gestação e a prole em ratas Wistar.

Quarenta e oito ratas Wistar adultas foram acasaladas com ratos machos adultos durante um período de cinco dias, na proporção de dois machos para três fêmeas por caixa. Foram feitos esfregaços vaginais diários de cada fêmea, através de lavagens vaginais com micropipetas contendo aproximadamente 10 µL de salina (NaCl a 0,9%), em seguida o material foi depositado sobre uma lâmina de vidro para microscopia e analisada por meio de microscopia de luz, nas objetivas de 10 e 40x. A presença de espermatozoides confirma a cópula, sendo que o dia de detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal é considerado como primeiro dia da gestação. Uma vez confirmada a gravidez, as ratas foram divididas em grupos (n=6-8) segundo o tratamento: veículo (água destilada), EETF 80, 240 e 720 mg/kg , fração hidroalcolica (HA-EETF) ou fração aquosa (Aq-EETF), tratadas diariamente por sonda oro-gástrica do primeiro ao décimo nono dia de prenhes.

A massa corporal de cada progenitora foi registrada nos dias 1, 5, 10, 15 e 20 de prenhes para avaliar o ganho de massa corporal. No 20º dia de

gestação, as ratas foram anestesiadas com uma associação de cetamina e xilazina, conforme previamente descrito e submetidas à cesariana, para retirada e avaliação do útero gravídico e seus conteúdos. Foi realizada, então, a contagem do número de fetos, bem como do número de sítios de implantação. Em seguida foi feita a pesagem dos fetos individualmente e das placentas de cada feto. Os fetos foram examinados macroscopicamente e avaliados quanto à presença de anomalias e/ou malformações congênitas. As ratas foram então eutanasiadas por excesso dos mesmos anestésicos, para a remoção e pesagem dos seguintes órgãos: ovários, fígado, rins, baço, coração, estômago e supra-renal. Os corpos lúteos foram contados, com auxílio de uma lupa, nos ovários direito e esquerdo de cada animal e os sítios de implantação uterina foram contados a olho nu nos dois cornos após a retirada dos fetos. Os parâmetros reprodutivos analisados foram os seguintes, OECD, 2001:

- **ÍNDICE DE IMPLANTAÇÃO** = $(n^{\circ} \text{ implantações} / n^{\circ} \text{ corpos lúteos}) \times 100$;
- **ÍNDICE DE REABSORÇÕES** = $(n^{\circ} \text{ reabsorções} / n^{\circ} \text{ implantes}) \times 100$ *sendo o n° de reabsorções = $(n^{\circ} \text{ implantes}) - (n^{\circ} \text{ fetos})$.
- **PERDAS PRÉ-IMPLANTES** = $(n^{\circ} \text{ de corpos lúteos} - n^{\circ} \text{ de implantes} / n^{\circ} \text{ de corpos lúteos}) \times 100$;
- **PERDAS PÓS-IMPLANTE** = $(n^{\circ} \text{ de implantes} - n^{\circ} \text{ de nativos} / n^{\circ} \text{ de implantes}) \times 100$
- **RELAÇÃO PROLE/MÃE**: representada pelo número de fetos nascidos vivos por fêmea prenhe.
- **ÍNDICE DE NASCIMENTO**: representado pela divisão do número de filhotes nascidos vivos pelo número total de filhotes nascidos multiplicado por cem.

4.4.4 Avaliação da toxicidade subcrônica e reprodutiva do EETF em ratos Wistar

Foram utilizados 32 ratos sexualmente maduros (180-240g), divididos aleatoriamente em 4 grupos, com 6-8 animais, segundo os tratamentos: veículo (água destilada), EETF a 80, 240 e 720 mg/kg. Os animais foram tratados

diariamente durante 30 dias por via oral através de sonda oro-gástrica (gavagem).

A massa corporal foi avaliada nos dias 1, 3, 10, 17, 24 e 30. No trigésimo dia, após o processo de eutanásia com excesso de cetamina e xilazina, como previamente descrito, os seguintes órgãos foram retirados para pesagem e avaliação histológica: fígado, rins, adrenais, testículos, vesículas seminais e próstata. Cada órgão foi dissecado e pesado em balança analítica, sendo que os órgãos pares foram pesados conjuntamente. O resultado foi expresso em massa absoluta e massa relativa (peso do órgão/peso corporal x 100).

4.5 Análise estatística

Os dados paramétricos, foram expressos como média \pm erro padrão da média e os não paramétricos e mediana e valor máximo e mínimo. Nas comparações entre os grupos foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett, para os dados paramétricos, e Kruskal-Walis para os dados não paramétricos. Em todas as situações foi adotado o nível de significância $p < 0,05$. Para análise dos dados e confecção dos gráficos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism® 5.03.

5 RESULTADOS

5.1 Toxicidade aguda de EETF e frações em camundongos

O tratamento agudo com EETF na dose de 1g/kg não provocou morte, já os tratamentos com EETF e FHEX-EETF na dose de 2g/kg provocou 40% de morte nos animais, nas primeiras 48 horas pós-tratamento (Tabela 2). Enquanto isso, o grupo tratado com 2g/kg da FHA-EETF apresentou apenas 20% de mortalidade e essas mortes só ocorreram após 72 horas do tratamento agudo.

Tabela 2 - Mortalidade de camundongos Swiss (fêmeas) após tratamento agudo, até 14 dias, com extrato etanólico (EETF), fração hidroalcolica (FHA-EETF), fração aquosa (FAq-EETF) ou fração hexanica (FHEX-EETF) da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

	Tratamento				
	Veículo	EETF 2g/kg	FHA-EETF 2g/kg	FAq-EETF 2g/kg	FHEX-EETF 2g/kg
Número de mortes	0/5	2/5	1/5	0/5	2/5
% morte	0	40	20	0	40

Ao fim dos 14 dias de observação foi avaliado o ganho de peso dos animais sobreviventes, segundo o tratamento. As médias de ganho de peso dos grupos tratados com EETF ($5,37 \pm 1,09\%$), FHA-EETF ($4,14 \pm 1,50\%$), FAq-EETF ($3,99 \pm 1,53\%$) e FHEX-EETFA ($4,48 \pm 1,65\%$) não tiveram alteração significativa em relação ao grupo veículo ($3,90 \pm 1,15\%$) (Figura 6). Não houve alteração no consumo de ração nos animais tratados com extrato ou frações em relação ao veículo. Com relação ao consumo de água, todos os animais tratados com extrato e frações diminuíram significativamente a ingestão de água em relação ao grupo controle, sendo a redução ainda maior nos tratados com as frações (Tabela 3).

Figura 6 - Ganho de peso de camundongos Swiss (fêmeas) por 14 dias após tratamento agudo com extrato etanólico (EETF), fração hidroalcolica (FHA-EETF), fração aquosa (FAq-EETF) ou fração hexanica (FHEX-EETF) da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart.& Zucc.

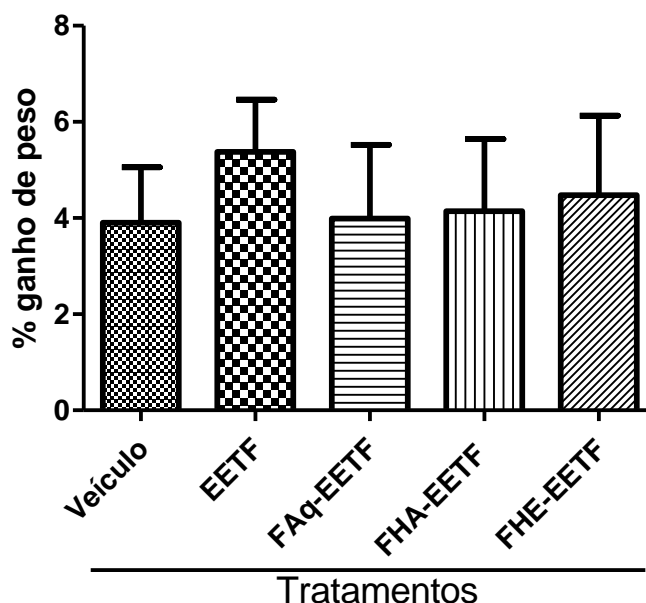


Tabela 3- Consumo diário de água e ração (média±epm) de camundongos Swiss (fêmeas) durante 14 dias, após tratamento agudo com extrato etanólico (EETF), fração hidroalcolica (FHA-EETF), fração aquosa (FAq-EETF) ou fração hexanica (FHEX-EETF) da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

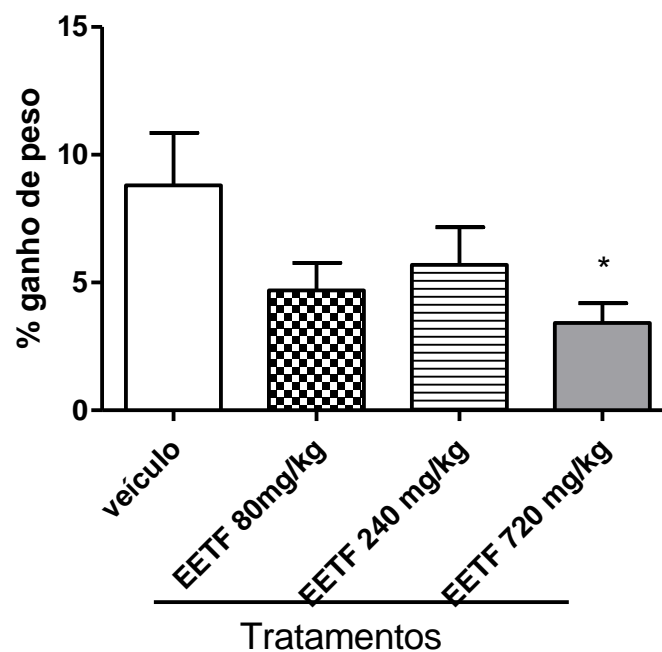
Tratamento	Parâmetro	
	Água (mL)	Ração (g)
Veículo	21,83 ±1,76	3.24 ±0,29
EETF	13,25±1,50*	4.58 ±0,52
FAq- EETF	8,35±1,15**	4.41±0,71
FHA-EETF	8,14±0,91**	4.98±0,52
FHEX-EETF	8,41±1,00**	3.33±1,11

Nota: A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de *p < 0,05,** p <0,0001 vs veículo.

5.2 Efeitos do tratamento subcrônico com EETF ou frações em ratas Wistar

Observou-se que o tratamento com EETF alterou o ganho de massa corporal das fêmeas, sendo que o grupo veículo apresentou ganho de massa de $8,8 \pm 5,02\%$ e a dose de 720 mg/kg reduziu esse ganho para $3,41 \pm 1,91\%$ (Figura 7). Esta alteração foi encontrada sem ocorrer alteração no consumo de ração ou de água desses grupos (Tabela 4).

Figura 7- Ganho de peso de ratas Wistar após 30 dias de tratamento com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.



Nota: A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de * $p < 0,05$ vs veículo.

Tabela 4- Consumo diário de ração e água por ratas Wistar tratadas durante 30 dias com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

Tratamento	Parâmetro	
	Água (mL)	Ração (g)
Veículo	24,88 ±4,22	9,79 ±0,44
80 mg/kg	23,43 ±3,39	8,90 ±0,43
240 mg/kg	26,78 ±4,32	9,33 ±0,51
720 mg/kg	19,96 ±3,42	8,63 ±0,44

O tratamento subcrônico com as frações FHA-EETF e FHAq-EETF na dose de 240mg/kg não alterou a evolução do peso das ratas (Figura 8), não alterou o consumo de água bem como o consumo de ração em relação aquelas que foram tratadas com água destilada (Tabela 5).

Figura 8- Ganho de peso de ratas Wistar após 30 dias de tratamento com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

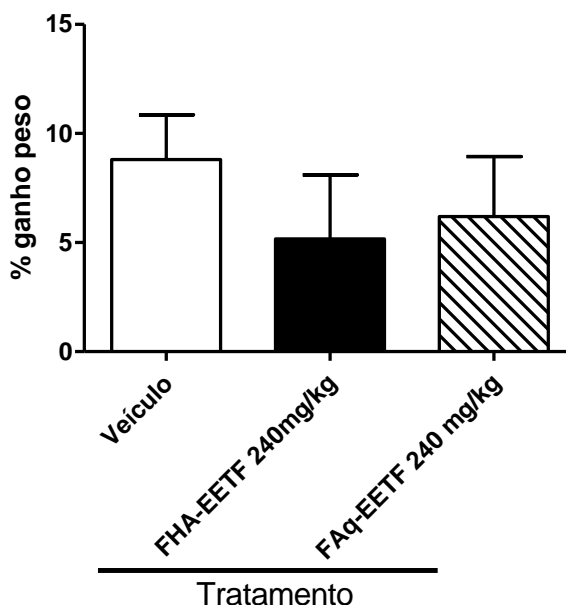


Tabela 5- Consumo diário de ração e água (média±epm) de ratas Wistar tratadas durante 30 dias com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

Tratamentos	Água (mL)	Ração (g)
Veículo	24,88 ±4,22	9,79 ±0,44
FHA-EETF 240 mg/kg	21,54±3,89	9,73 ± 2,28
FAq-EETF 240 mg/kg	25,55 ±4,27	11,70 ±2,62

A ocorrência de estros e o intervalo entre estros observados nos grupos tratados com EETF, FHA-EETF e FAq-EETF não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo veículo (Figura 9 e 10).

Figura 9 - Intervalo entre estros (A) e número de estros (B) em ratas Wistar submetidas aos tratamentos com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. durante 30 dias

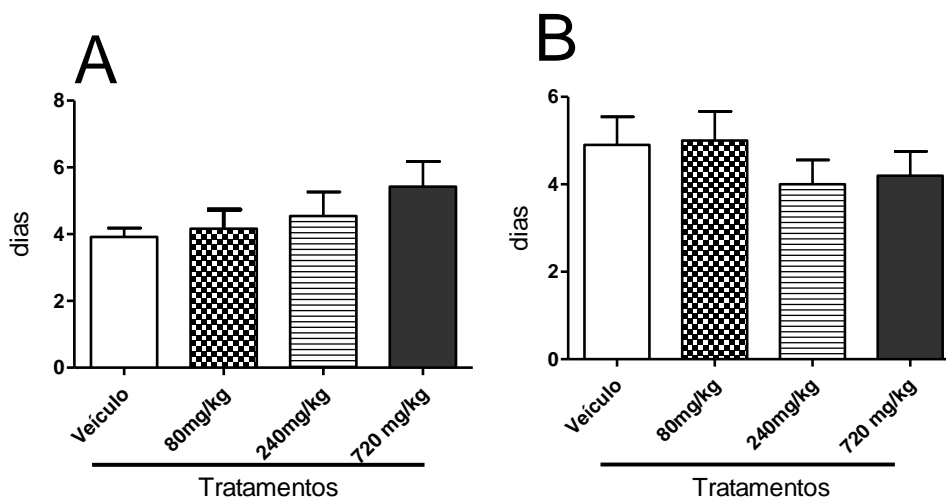
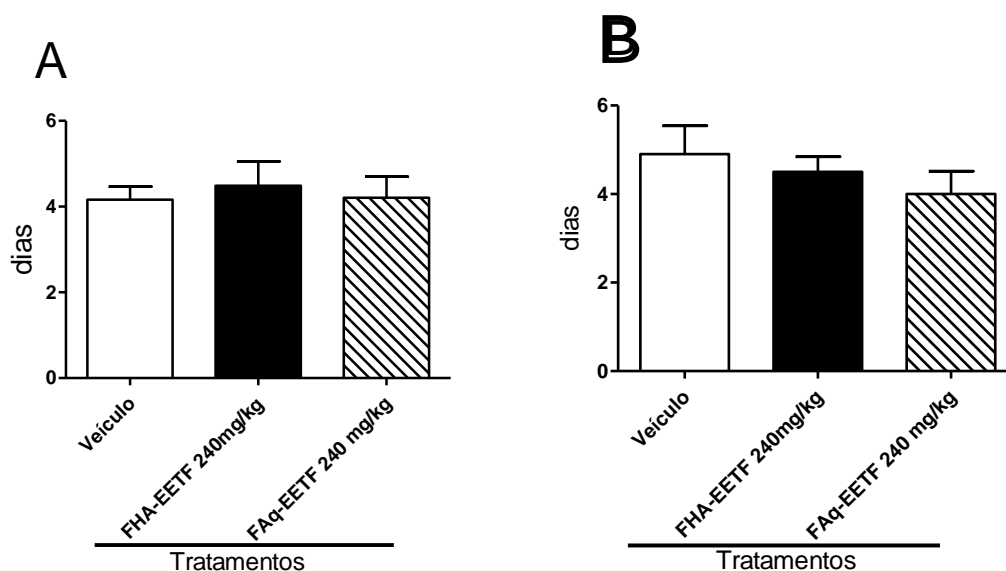


Figura 10 - Intervalos entre estros (A) e número de estros (B) em ratas Wistar submetidas aos tratamentos com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. durante 30 dias



A contagem de folículos ovarianos e identificação de etapas de desenvolvimento a partir dos cortes histológicos dos ovários das ratas tratadas mostraram que não houve diferença entre médias dos grupos avaliados (Tabela 6 e 7).

Tabela 6- Número médio de folículos ovarianos de ratas Wistar submetidas aos tratamentos com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc durante 30 dias

Tratamento	Folículo primário	Folículo secundário	Folículo terciário
Veículo	5,17± 0,95	5,17± 0,79	2,17± 0,40
80 mg/kg	4,14± 0,67	5,14± 0,83	2,20± 0,37
240 mg/kg	6,88± 0,77	7,38± 1,46	2,50± 0,50
720 mg/kg	3,60± 0,87	5,00± 0,84	1,40± 0,24

Tabela 7- Número médio de folículos ovarianos de ratas Wistar submetidas aos tratamentos com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq - EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. durante 30 dias

Tratamento	Folículo primário	Folículo secundário	Folículo terciário
Veículo	5,17± 0,95	5,17± 0,79	2,17± 0,40
FHA-EETF 240 mg/kg	8,33±0,67	5,57±1,17	3,00±0,44
FAq-EETF240 mg/kg	6,00±1,08	4,60±1,08	3,20±0,73

Quanto ao peso relativo dos órgãos dos animais, os grupos tratados com EETF, FHA-EETF e FAq-EETF não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo veículo (Tabela 8 e 9)

Tabela 8 - Massa relativa (mg/100g de peso corporal) dos órgãos de ratas Wistar submetidas aos tratamentos com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. durante 30 dias

Tratamento	Fígado	Rins	Baço	Coração	Útero	Ovários	Estômago
Veículo	3254 ±99,44	677,2 ±15,46	341,2 ±18,81	343,4 ±8,640	242,1 ±27,18	51,61 ±3,322	640,9 ±27,16
80mg/kg	3246 ±121,7	675,4 ±25,76	385,6 ±23,34	329,4 ±10,61	279,1 ±34,05	55,62 ±3,833	686,5 ±31,10
240mg/kg	3579 ±164,6	664,8 ±25,73	374,2 ±23,03	324,5 ±12,94	228,7 ±30,26	48,44 ±2,878	677,4 ±22,88
720mg/kg	3525 ±131,3	708,4 ±19,39	358,5 ±10,41	330,3 ±8,244	206,8 ±15,80	44,17 ±3,851	742,3 ± 29,74

Tabela 9 - Massa relativa (mg/100g de peso corporal) dos órgãos de ratas Wistar submetidas aos tratamentos com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. durante 30 dias

Tratamento	Fígado	Rins	Baço	Coração	Útero	Ovário	Estômago
Veículo	3254 ±99,44	677,2 ±15,46	341,2 ±18,81	343,4 ±8,640	242,1 ±27,18	51,61 ±3,322	640,9 ±27,16
FHA-EETF 240mg/kg	3384 ±141,8	735,1 ±53,18	416,0 ±28,18	328,8 ±12,34	261,8 ±38,79	54,25 ±3,714	592,0 ±28,06
Aq-EETF 240mg/kg	3226 ±43,65	657,2 ±24,52	344,1 ±24,33	300,2 ±9,607	211,8 ±6,336	43,05 ±4,65	661,8 ±6,60

Amostras de soro foram analisadas para: creatinina, ALP, AST, uréia e fosfatase alcalina. Todos os grupos apresentaram resultados estatisticamente semelhantes como mostrado na tabela 10.

Tabela 10- Parâmetros bioquímicos avaliados em ratas Wistar submetidas aos tratamentos com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc durante 30 dias.

Tratamento	Creatinina	ALP	AST	uréia	fosfatase alcalina
Veículo	0,29±0,04	57,9±6,10	187,1±30,5	105,6±7,0	96,4±27,2
80 mg/kg	0,31±0,02	54,3±2,95	180,7±13,1	90,3±6,54	194,7±76,9
240 mg/kg	0,29±0,03	45,1±7,84	238,7±42,1	88,4±10,30	165,8±27,7
720 mg/kg	0,23±0,04	38,4±5,84	181,2±14,9	102,2±12,29	132,6±64,9

Tabela 11- Parâmetros bioquímicos avaliados em ratas Wistar submetidas aos tratamentos com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq - EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. durante 30 dias

	ALP	AST	uréia	fosfatase alcalina
Tratamento				
Veículo	57,9±6,10	350,6±94,4	105,6±7,0	96,4±27,20
FHA-EETF 240 mg/kg	52,4±3,75	198,3±31,67	40,43±2,51	85,6±24,18
FAq-EETF 240 mg/kg	52,5±4,40	189,6±38,99	41,0±2,68	77,37±30,80

5.3 Parâmetros de toxicidade reprodutiva em ratas Wistar fêmeas prenhes

O tratamento com EETF, FHA-EETF e FAq-EETF em ratas não provocou alteração na evolução do peso materno quando comparado ao grupo veículo (Figura 11 e 12)

Figura 11- Ganho de peso de ratas Wistar prenhes nos 20 dias de tratamento com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

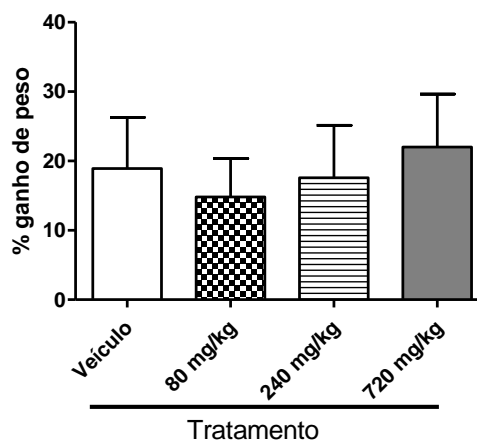
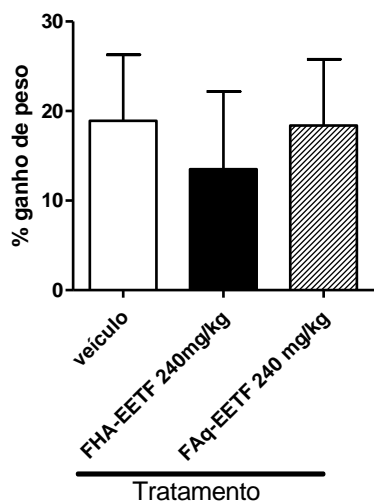


Figura 12- Ganho de peso de ratas Wistar prenhes nos 20 dias de tratamento com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.



Os parâmetros reprodutivos: relação prole/mãe, número de reabsorções, índice de reabsorção, número de implantações, índice de implantação, peso da placenta, peso fetal e peso do útero não apresentaram diferença significativa em relação às médias do grupo veículo. (Tabela 12).

Tabela 12- Médias (\bar{x}) e medianas (\tilde{x}) dos parâmetros reprodutivos avaliados em ratas Wistar prenhes tratadas, durante 20 dias, com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.

Variáveis reprodutivas		Tratamentos			
		Veículo	80 mg/kg	240 mg/kg	720 mg/kg
Índice reabsorção	\tilde{x}	14,28 (0,00-25,00)	3,570 (0,00-11,10)	10,00 (0,00-15,38)	0,0 (0,0-10,00)
Índice implantação	\tilde{x}	100,0 (80,00-100,0)	90,00 (63,60-93,33)	100,0 (77,00-100,0)	100,0 (100,0-100,0)
Perdas pré-implantes	\tilde{x}	6,250 (0,0-20,00)	10,00 (6,000-36,36)	0,0 (0,0-22,22)	0,0 (0,0-0,0)
Perdas pós-implantes	\tilde{x}	0,0 (0,0-16,16)	7,142 (0,0-11,11)	10,00 (0,0-15,38)	0,0 (0,0-9,090)
Índice de nascimento	\tilde{x}	100,0 (100,0-100,0)	100,0 (100,0-100,0)	100,0 (100,0-100,0)	100 (100,0-100,0)
Relação Prole/Mãe	\bar{x}	8,00	10,14	9,00	10,75
Peso placenta	\bar{x}	0,53±0,01	0,50±0,01	0,55±0,01	0,57±0,01
Peso feto	\bar{x}	2,91±0,07	2,60±0,05	3,10±0,06	2,98±0,07

O tratamento das ratas prenhes com FHA-EETF 240mg/kg e FAq-EETF 240 mg/kg provocou aumento nos valores médios do peso fetal por ninhada (Tabela 13).

Tabela 13- Médias, \bar{x} , e medianas, \tilde{x} , dos parâmetros reprodutivos avaliados em ratas Wistar prenhes tratadas, durante 20 dias, com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc.

Variáveis reprodutivas		Tratamentos		
		Veículo	FHA-EETF	FAq-EETF
Índice reabsorção	\tilde{x}	14,28 (0,00-25,00)	0,0 (0,0-28,57)	0,0 (0,0-18,18)
Índice implantação	\tilde{x}	100,0 (80,00-100,0)	96,50 (80,00-100,0)	100,0 (81,80-100,0)
Perdas pré-implantes	\tilde{x}	6,250 (0,0-20,00)	3,000 (0,0-20,00)	0,0 (0,0-9,000)
Perdas pós-implantes	\tilde{x}	0,0 (0,0-16,16)	12,50 (0,0-28,57)	0,0 (0,0-27,27)
Índice de nascimento	\tilde{x}	100,0 (100,0-100,0)	100,0 (100,0-100,0)	100,0 (100,0-100,0)
Relação Prole/Mãe	\bar{x}	8,00	8,16	9,85
Peso placenta	\bar{x}	0,53±0,01	0,56±0,01	0,54±0,01
Peso feto	\bar{x}	2,90±0,07 ^a	3,58±0,05 ^b	3,73±0,08 ^b

Nota: A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste Dunett ^b p <0,001 vs veículo.

De forma semelhante às fêmeas nulíparas, Tabelas 8 e 9, os animais prenhes tratados com EETF, FHA-EETF e FAq-EETF não apresentaram diferença entre os pesos relativos de órgãos em relação aos do grupo veículo (Tabela 14 e 15).

Tabela 14- Massa relativa (mg/100g de peso corporal) dos órgãos de ratas Wistar prenhes submetidas ao tratamento, durante 20 dias, com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc.

	Fígado	Rins	Baço	Coração	Útero	Ovário	Estômago
Veículo	3584 ±130,0	529,0 ±22,14	367,0 ±15,56	278,0 ±9,881	1274 ±144,1	34,64 ±5,449	571,7 ±31,05
80mg/kg	4044 ±8129	578,5 ±22,34	306,5 ±15,80	291,1 ±12,22	1614 ±207,1	38,36 ±12,14	539,5 ±32,17
240mg/kg	4009 ±135,6	532,1 ±28,69	332,9 ±7,956	274,5 ±18,99	1435 ±98,56	43,11 ±10,02	636,6 ±33,71
720mg/kg	3947 ±156,7	531,5 ±11,79	320,4 ±21,54	264,7 ±11,86	1401 ±189,6	42,75 ±4,310	587,4 ±32,67

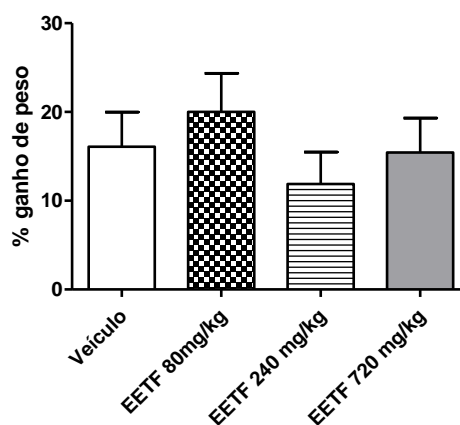
Tabela 15- Massa relativa de órgãos avaliados de ratas Wistar prenhes tratadas, durante 20 dias, com fração hidroalcolica (FHA-EETF) ou fração aquosa (FAq -EETF) do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc.

	Fígado	Rins	Baço	Coração	Útero	Ovário	Estômago
Veículo	3584 ±130,0	529,0 ±22,14	367,0 ±15,56	278,0 ±9,881	1274 ±144,1	34,64 ±5,449	571,7 ±31,05
FHA-EETF 240mg/kg	3611 ±231,9	565,3 ±26,51	317,5 ±12,84	294,5 ±20,70	1854 ±109,1	35,61 ±1,268	602,7 ±29,22
FAq-EETF 240mg/kg	3172 ±214,6	495,3 ±22,40	347,4 ±23,90	280,8 ±13,93	2060 ±139,5	48,15 ±4,961	516,5 ±20,42

5.4 Efeitos do tratamento subcrônico com EETF em ratos Wistar machos

O tratamento com EETF por 30 dias não provocou alteração em ganho de peso, consumo de ração e consumo de água nos animais (Figura 13 e Tabela 16).

Figura 13- Ganho de peso de ratos Wistar após 30 dias de tratamento com água destilada (veículo) ou com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc.



Nota: Não houve diferença entre os grupos, verificada na análise de variância (ANOVA) seguida do Teste Dunett.

Tabela 16- Consumo diário de ração e água de ratos Wistar tratadas durante 30 dias com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc.(EETF)

Tratamentos	Água (mL)	Ração (g)
Veículo	39,78± 7,00	19.94±2.875
80 mg/kg	38,85± 3,03	19.26±2.552
240 mg/kg	26,72± 4,84	21.15±2.948
720 mg/kg	28,31± 4,29	17.88±2.664

No tratamento por 30 dias com EETF nas doses de 80, 240 e 720 mg/kg não provocou alteração no peso relativo dos órgão de ratos Wistar em relação ao grupo veículo (Tabela 17 e 18)

Tabela 17- Massa relativa (mg/100g de peso corporal) dos órgãos de ratos Wistar submetidos ao tratamento, durante 30 dias, com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc (EETF)

Tratamentos	Fígado	Rins	Baço	Coração	Estômago
veículo	3196± 96,1	680,4± 12,08	296,2± 11,33	328,3± 16,78	526,8± 18,82
80mg/kg	3199± 153,9	596,1± 85,67	261,1± 9,643	339,8± 23,10	487,9± 75,06
240mg/kg	3212± 76,9	691,0± 6,95	302,3± 83,24	349,5± 17,10	585,2± 6,71
720mg/kg	2963± 85,5	533,4± 16,13	306,2± 22,20	298,8± 9,59	533,4± 16,13

Tabela 18- Massa relativa (mg/100g de peso corporal) dos órgãos de ratos Wistar submetidos ao tratamento, durante 30 dias, com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. Zucc (EETF)

Tratamentos	Vesícula seminal	Próstata	Testículo	Epidídimo
Veículo	507,8± 36,16	160,8± 9,29	1115± 33,13	253,1± 17,19
80mg/kg	446,3± 50,73	150,6± 9,96	1024± 46,46	175,1± 22,83
240mg/kg	367,3± 40,08	155,8± 23,17	1018± 8,29	268,6± 21,20
720mg/kg	396,3± 19,50	142,5± 11,59	1050± 29,44	220,8± 20,46

6 DISCUSSÃO

Propriedades antioxidantes de extratos e frações da *Terminalia fagifolia* e atividade farmacológicas observadas foram detectadas nos estudos de Sousa et. al (2007) e Ayres et al. (2009). Os resultados descritos nos referidos trabalhos estimularam a continuidade das pesquisas com esta espécie, por apresentar flavonoides como constituinte majoritário, que possuem potencial antioxidante, é possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema e desprotetor em outro, ou até mesmo que aumente as lesões induzidas em outros tipos de sistemas (MORAIS et. al, 2009). Diante deste contexto é necessário estudos toxicológicos dos extratos da planta a fim de corroborar com o aprofundamento no conhecimento das propriedades medicinais da *Terminalia fagifolia*.

Testes para estudo de toxicidade aguda são realizados no intuito de observar efeitos adversos que ocorram 24h após a administração da substância teste e nortear a faixa de dose que pode ser administrada em protocolos subcrônicos, sem que ocorra mortalidade e elucidação de órgãos e sistemas alvos da toxicidade aguda (VALADARES, 2006).

No modelo experimental adotado, observando: a mortalidade, o ganho de peso, o consumo de água e o consumo de ração, considerando-se os padrões da OECD o tratamento agudo com 2g/kg de EETF, FHA-EETF, FAq-EETF ou FHEX-EETF mostrou-se praticamente atóxico neste ensaio. Pelos resultados obtidos os extratos foram classificados na categoria 5, onde a estimativa para a dose letal média oral é de $2\text{g/kg} < \text{DL}_{50} < 5\text{g/kg}$. O mesmo documento não aconselha a realização do teste de toxicidade aguda utilizando a dose de 5000mg/kg, como uma forma de proteção à vida do animal (OECD, 2001).

O experimento de toxicidade aguda nortear a escolha das doses a serem utilizadas nos protocolos subcrônicos. O nível de dose foi estabelecido em três valores suficientemente espaçadas (razão 3) para mostrar diferença na graduação dos efeitos tóxicos. Nos grupos tratados com EETF as doses testes foram de 80, 240 e 720 mg/kg e para os grupos tratados com FHA-EETF e

FAq-EETF foi de 240 mg/kg valor próximo da dose terapêutica sugerida em estudos preliminares (dados não publicados).

O estudo toxicológico experimental com animais tem como propósito a avaliação de risco de determinada substância a organismos vivos. Um agente que produz um efeito adverso durante o tratamento experimental (morte, anomalias estruturais, alteração no crescimento e déficit funcionais) pode representar um perigo para os seres humanos. Esta suposição é baseada em comparações de estudos de agentes tóxicos para humanos (US EPA, 1996). Respalhando-se nas resoluções nacionais e internacionais, o desenho deste estudo experimental buscou também investigar os possíveis efeitos deletérios do tratamento subcrônico com EETF, FHA-EETF e FAq-EETF sobre o sistema reprodutor feminino (nulíparas e prenhes) e masculino bem como nos outros órgãos vitais e de grande fluxo sanguíneo (fígado, rins e coração).

Nas ratas nulíparas, o tratamento com EETF, FHA-EETF e FAq-EETF durante 30 dias não provocou mudanças de duração, seqüência do ciclo estral e repetibilidade dos ciclos seguinte, em relação aos animais do grupo veículo. Estes dados indicam que o tratamento não promoveu distúrbio no eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, preservando a função reprodutiva (ANDREWS et al., 2002).

Os sinais de intoxicação sistêmica foram avaliados a partir da redução da massa corporal dos animais experimentais, redução do consumo de água e ração, alterações comportamentais, apatia e outras alterações que podem sinalizar, por exemplo, injúria hepática. Apenas as fêmeas tratadas com EETF na dose de 720 mg/kg apresentaram redução do ganho de peso massa corpórea) em relação ao grupo veículo, sem alteração no consumo de água e ração.. Considerando-se que no experimento com machos não houve redução do ganho nas mesmas doses do experimento com fêmeas e que não se observou nenhum sinal relevante de intoxicação sistêmica nos 30 dias de tratamento com EETF e frações, pode-se considerar que as doses estudadas não foram capazes de induzir efeitos tóxicos relevantes (US EPA, 1996).

Efeitos tóxicos sobre os sistemas biológicos podem ser observados pelos padrões séricos de ureia, creatinina, cujas alterações fornecem indícios

de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo protéico (VIJAYALAKSHMI; MUTHULAKSHAMI, SACHADANANDAM, 2000; ADEBAYO et al., 2003;). As alterações nas enzimas aminotransferases (AST e ALT U/L) e fosfatase alcalina séricas são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas. Uma droga não provoca danos ao fígado sem interferir com a atividade normal de suas enzimas (ALÍÁ et al., 2003). O perfil bioquímico dos animais demonstrou semelhança estatística entre os grupos e que todos os parâmetros avaliados estão dentro dos valores de referência (RODRIGUES et al., 2006), o que não indica níveis significantes de toxicidade hepática ou renal no tratamento subcrônico.

A exposição materna a agentes químicos, durante o período de gestação, pode resultar em alterações no desenvolvimento do concepto. Essas alterações dependem de fatores inerentes ao organismo materno, da funcionalidade placentária ou de uma ação direta do próprio organismo embriofetal que, por vez, pode ocasionar a morte do concepto, malformações e/ou anomalias, ou ainda prejuízo no desenvolvimento físico e/ou comportamental do recém-nascido (EOCD, 2001)

O uso de plantas medicinais na gestação pode resultar em diferentes alterações no desenvolvimento embriofetal, devido à interferência na implantação embrionária, com efeito abortivo (embrioletalidade) ou embriofetoxidade (LEMÔNICA; DAMASCENO, DI-STASI, 1996; LYRA et al., 2005;). Neste estudo, avaliou-se a performance reprodutiva materna, por meio da observação dos parâmetros, peso materno, número de fetos vivos e porcentagem de perdas pré e pós-implantação.

Levando em consideração a maior possibilidade de absorção do medicamento no período gestacional, durante a realização dos ensaios toxicológicos, deve-se ficar atento aos sinais clínicos, evidentes de toxicidade materna, que resultem na morte ou redução no ganho de peso corporal.

A perda de massa corporal é um dos principais indicadores de toxidade materna, pois o ganho de peso insuficiente pode acarretar a restrição de crescimento intra-uterino (LYRA et al., 2005). Neste estudo, não houve

diferença significativa de ganho de peso entre as ratas do grupo veículo e as tratadas com EETF, FAq-EETF ou FHA-EETF.

No período pré-implantação o embrião se encontra com células indiferenciadas em divisão mitótica. A redução do número de células no embrião, durante essa fase, pode induzir retardo na formação do blastocisto (KOLA & FOLB, 1986) e, conseqüentemente, aumento nas perdas pré e pós-implantação. As taxas de perdas pré e pós-implantação constituem a relação entre o número de oócitos liberados e aqueles que, depois de fecundados, não conseguiram ser implantados no útero. Enquanto que perda pós-implantação referem-se à relação entre o número de blastocistos implantados e aqueles que não conseguiram se desenvolver. Ao blastocisto implantado que não desenvolveu dá-se o nome de “reabsorção” e isso indica a falha no desenvolvimento do embrião (ALMEIDA; LEMONICA, 2000).

Os resultados apontam a não interferência dos tratamentos com EETF, FAq-EETF e FHA-EETF nos padrões de desenvolvimento de fases pré e pós implantação. A redução do peso fetal no grupo tratado com 80mg/kg de EETF pode apontar efeito fetotóxico, observação não confirmada quando do tratamento com doses maiores (240 e 720 mg/kg), mostrando não ser dependente da dose e por isso uma evidência pouco consistente de toxicidade. Já nos grupos tratados com FAq-EET e FHA-EETF observou-se aumento significativo de peso nos fetos o que pode estar associado a ganho de massa corporal dos fetos ou apenas acúmulo de líquidos (LYRA et al., 2005). Isso pode ser um efeito favorável no caso tenha ocorrido um ganho de massa por crescimento dos fetos.

As principais variáveis analisadas em toxicologia sistêmica e reprodutiva masculina são: desenvolvimento físico (ganho de peso e peso corporal), peso de órgãos não reprodutivos, peso dos testículos e glândulas acessórias (OSHIO; GUERRA, 2009). O monitoramento da massa corporal durante o tratamento provê um índice do estado geral de saúde dos animais, e essa informação pode ser importante para a interpretação dos efeitos reprodutivos. Redução na massa corporal ou redução no ganho de massa pode refletir uma variedade de respostas, incluindo anorexia induzida pelo tratamento, ou

toxicidade sistêmica (US EPA, 1996). Na presente pesquisa, não houve diferença no ganho de massa de machos dos grupos tratados com EETF, bem como não ocorreu nenhuma alteração nos outros parâmetros toxicológicos observados, como alteração peso de órgãos, alteração de consumo de ração ou água.

7 CONCLUSÃO

O número de mortes após o tratamento agudo resultou na estimativa de dose letal acima de 2 g/kg e abaixo de 5g/kg para extrato etanólico e frações O tratamento subcrônico com extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. e frações (hidroalcoólica e aquosa) não alterou o ganho de peso, consumo de ração e água, ocorrência de estros, intervalos entre estros e perfis bioquímicos. Além disso, não provocou mudanças no aspecto macroscópico e microscópico dos órgãos dos animais. No ensaio de toxicidade gestacional não houve diferença entre os grupos controle e tratados quanto ao número de fetos vivos e mortos, peso das placentas e dos ovários, número de locais de implantação, número de sítios de reabsorção, número de corpos lúteos nos ovários, nem quanto as taxas de perda pré e pós-implantação. No ensaio de avaliação da toxicidade subcrônica sistêmica e reprodutiva em ratos Wistar tratados com EETF, não foram observadas alterações nos órgãos reprodutivos avaliados. Por conseguinte, conclui-se que o extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae) e suas frações não apresentam efeito tóxico agudo ou subcrônico sistêmico ou reprodutivo em camundongos e ratos machos ou fêmeas, no limite das doses utilizadas neste experimento, indicando ser seguro para aplicação oral e a possibilidade de aproveitamento do potencial terapêutico da espécie na produção de fitoterápicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAYO, J.O.; YAKUBU, M.T.; EQWIM, E.C.; OWOYOLE, V.B.; ENAIBE, B.U. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n.1, p.69-72, 2003.

ALÍA, M.; HORCAJO, C.; BRAVO, L.; GOYA, L.. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. **Nutrition Research**, v. 23, n.9, p.1251-1267, 2003.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BACKER, M. toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experimental in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 209-217, 2002.

ALMEIDA S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado espécies vegetais úteis**, Embrapa: Planatina, 1998.

ALMEIDA, F. C.G.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p.53-60, 2000

ANDREWS P.; FREYBERGER, A.; HARTMANN, E.; EIBEN, R.; LOOF, I.; SCHMIDT, U.; TEMEROWSKI, B.; FOLKERTS, A.; STHAL, B.; KAYSER, M. Detecção sensível dos efeitos endócrinos do análogo estrogênio etinilestradiol usando um rato modificado melhorado subaguda protocolo do estudo (OECD não. 407). **Archives of Toxicology**, v.76, n.4, p.194-202, 2002.

AYRES, M. C. C.; CHAVES, M.H.; VILEGAS, D. R. W.; VIEIRA JR., G.M. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, 2009 .

BACHA, W.J., WOOD. Color atlas of veterinary histology. Lea and Febiger, **Philadelphia**. 269p.1990

BENINI, B. E.; SARTORI, M. A. B.; BUSCH, G. C.; REMPEL, C.; SCHULTZ, G.; STROHSCHOEN, A. G. Valorização da flora nativa quanto ao potencial fitoterápico. **Destaques Acadêmicos**, v. 2, n.3, 2010.

BIANCO, B.; CHRISTOFOLI, D. M.; SOUZA, A.M.B.; BARBOSA. The role of the endocrine disruptors in the physiopathology of endometriosis: review of literature, **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde** v.35, n.2, p.103-110, 2010.

BILA, D. M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BRASIL. Secretaria de Políticas de Saúde. **Proposta de política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL^a Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Sistema de Legislação em Vigilância Sanitária (VISALEIS). **Resolução RDC n. 48** de 16 de março de 2004.

BRASIL^b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Sistema de Legislação em Vigilância Sanitária (VISALEIS). **Resolução RE n. 90** de 16 de março de 2004

BRASIL. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BROLIO, M.P.; AMBROSIO, C.E.; FRANCIOLLI, A.R.; MORINI, A.C.; GUERRA, R.R.; MIGLINO, M.A. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n.4, p.222-232, 2010.

CAMPELLO, C.C.; CARVALHO, V.L.; VIEIRA, K.M.; FARIAS, D.F.; MAIA, A.A.B.; MORAIS, J.K.S.; CARVALHO, A.F.U.; VASCONCELOS, I.M. Desempenho e parâmetros séricos de ratos alimentados com dietas contendo soja integral crua. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal**, v. 46, n. 3, p. 188-198, 2009.

CASTRO, A. A. J. F.; MARTINS, F. M. ; FERNANDES, A. G. The woody flora of cerrado vegetation in the state of Piauí., northeastern Brazil. **Edinburg Journal of Botany**, v.55, p. 455-472, 1998.

CEC - Commission of the European communities. On the implementation of the Community strategy for endocrine disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. **Communication from the commission to the council and the European parliament, Brussels**, SEC 1372, 2004.

CEPRO. Fundação Centro de Pesquisas Economicas e Sociais do Piaui. **Cerrados piauienses: estudo preliminar de suas potencialidades**. Teresina, 63p, 1992.

CORREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, IBDF, vol. 1, n.3, p. 5, 1978.

DEVI, C.S.S.; SUNDARESAN, R.; NARAYAN, S.; VANI, G. Gastroprotective effect of *Terminalia arjuna* bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. **Chemico-Biological Interactions**, v.167, n. 1, p. 71-83, 2007.

DORNAS W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES R. G.; SANTOS, A. F. ; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, 2007.

FERREIRA, B. E. S.; COSTA, R. C.; NUNEZ, C. V. Some dimensions of biodiversity market in Manaus-AM. **Ateliê Geográfico**, Goiania, v. 5, n. 13, p. 103-117, 2011.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; SANTANA, A. L. B. D.; ALVES, M. M.; MATOS, M. F. C.; SCALIANTE, A. M.. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, 2006.

KOLA, I.; FOLB, P. Chlorpromazine inhibits the mitotic index, cell number, and the formation of blastocyst, and delays implantation of CBA mouse embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.76, p. 527-536, 1986.

LEMONICA, L. P.; DAMASCENO, D. C.; DI-STASI, I. C. Study the embryotoxic effects of an extract of Rosemary (*Roraima officinalis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p.223-227, 1996.

LEMMEN, J. G.; ARENDS, R. J.; VANDERSAAG, P. T. In vivo imaging of activated estrogen in utero by estrogens and bisphenol A. **Environmental Health Perspectives**, v.112, n.15, p.1544-9, 2004.

LINDOSO, G. S.; FELFILI, J. M.; COSTA, J. M.; CASTRO, A.A.J. Diversidade e estrutura do cerrado sensu stricto sobre areia (Neossolo quartzarênico) na chapada grand e meridional, Piauí. **Revista Biologia Neotropical**, v. 6, n.2, p.45-61, 2009.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras – **Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, v.2. 2ªed. Editora Plantarum. Nova Odessa – SP. 368 p. 2002.

LOURENÇO, A.C.S.; MIGUEL, L.K.; GUARIDO, K.L.; SENSIATE, L.A.; SALLES, M.J.S. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embriofetal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.407-413, 2009.

LYRA, M.M.A. ; SILVA, J.H.C.; LIMA, C.R.; LIMA, V.M.; ARRUDA, V. M.; ARAÚJO, A. V.; RIBEIRO, A. R.; ARRUDA, A. C.; FRANGA, M. C.; LAFAYETE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Estudo toxicológico reprodutivo da *Azadirachta indica* A JUSS. (Neem). **Revista Fitos (ALANAC)**, v.1, n.2, p.53-57, 2005.

MANNA, P.; SINHA, M.; SIL, P.C. Aqueous extract of *Terminalia arjuna* prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders. **BMC. Complement Alternative Medicine**, v.30, n.6, p.33, 2006.

MANOSROI, A.; JANTRAWUT, P.; AKIHISA, T.; MANOSROI W; MANOSROI, J. In vitro anti-aging activities of *Terminalia chebula* gall extract. **Journal Pharmaceutical Biology**, v.48, n.4, p.469-481, 2010.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P.. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609-614, 2002.

MARTINEZ, M. T. S.; DIEGUEZ, T. S.; CANSINO, N. S. C.; GARCIA, E.A.; SAMPEDRO, J.G. Innovacion de productos de alto valor agregado a partir de latuna mexicana. **Revista Mexicana de Agronegocios**, v.14, n. 27, p. 435-441, 2010.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTE, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, 2009 .

MYRES, N. Threatened biotas: `hotspots' in tropical forests. **Environmentalist**, v.8, p.187-208, 1988.

NAVA, A.; ROMAN, S.S. Efeito do antimoníato de meglumina sobre a performance reprodutiva de camundongos prenhes. **Vivências**, v. 2, n. 3, p.201-212, 2006.

OECD's Guideline for the testing of chemicals – nº 407: “Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents” 1995.

OECD's Guideline for the testing of chemicals – nº 414: “prenatal developmental toxicity study” 2001,

OSHIO, L.T.; GUERRA, M. O. Métodos em toxicologia do sistema reprodutor masculino e fertilidade em roedores. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 3, p. 148-152, 2009.

PFUNDSTEIN, B.; EL DESOUKY, S.K.; HULL WE, H. R; ERBEN, G.; OWEN, R. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. **Phytochemistry** , v.71, n.10, p.1132-48,2010.

PRASAD, L.; KHAN, T.H.; JAHANGIR, T. SULTANA, S. Abrogation of DEN/Fe-NTA induced carcinogenic response, oxidative damage and subsequent cell proliferation response by Terminalia chebula in kidney of Wistar rats. **Pharmazie**, v.62, n.10, p.790-7, 2007.

PONNUSANKAR,S.; PANDIT, S.; VENKATESH, M.; BANDYOPADHYAY, A.;MUKHERJEE, P.K. Cytochrome P450 Inhibition Assay for Standardized Extract of Terminalia chebula Retz. **Phytother Research**, v.25, n.1, p.151-4, 2011.

RAUBERT, C.; MELLO, F. B.; MELLO, J.R.B. Pre-clinic toxicological evaluations of a phytottherapic containing Aristolochia cymbifera, Plantago major, Luehea grangiflora, Myrocarpus frondosus, Piptadenia colubriana (Cassau Composto) in Wistar rats. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.34, n.1, p.15-21, 2006.

ROCHA-COELHO, F.B. & SANTOS, M.G. Plantas medicinais utilizadas pela Comunidade Mumbuca Jalapão - TO: Um estudo etnofarmacológico. Pesquisa e Conservação do Cerrado. Disponível em: <http://www.pequi.org.br/Coelho_&_Santos.pdf>., 2008.

RODRIGUES, E.R; MORETI, D.L.C; MARTINS, C.H.G; KASAI,A;STOPPA, M.A; ALVES,E.G; PAZ, K; LOPES,R.A; SALA, M.A; PETENUSCI, S.O. Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob a ação de planta medicinal. [XI. Chiococca Alba (L.) Hitchc]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s,v 8, n. 4, p. 169-172, 2006.

ROOP, J.K.; DHALIWAL, P.K.; GURAYA, S.S.. Extracts of Azadirachta indica and Melia azedarach seeds inhibit folliculogenesis in albino rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 6, June, 2005.

SANTOS, M. R. V.; SOUZA, V. H.; MENEZES, I. A. C.; BITENCURT, J. L.; REZENDE-NETO, J. M.; BARRETO, A. S.; CUNHA, F. A.; MARÇAL, R. M.; TEIXEIRA-SILVA, F.; QUÍNTANS-JÚNIOR, L. J.; BARBOSA, A. P. O. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e

morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 6, n. 10, p. 1-6, 2010.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L., S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H.. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.2, 2007.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, 2010.

SRIVASTAV, A.; CHANDRA, A.; SINGH, M.; JAMAL, F.; RASTOGI, P.; RAJENDRAN, S. M.; BANSODE, F. W.; LAKSSHMI, V. Inhibition of hyaluronidase activity of human and rat spermatozoa in vitro and antispermatogenic activity in rats in vivo by *Terminalia chebula*, a flavonoid rich plant. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n.2, p. 214-224, 2010.

TASDUQ, S. A.; SINGH, K.; SATTI, N. K.; GUPTA, D. K.; SURI, K. A.; JOHRI, R. K. *Terminalia chebula* (fruit) prevents liver toxicity caused by sub-chronic administration of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in combination. **Human & experimental toxicology**, v. 25, n.3, p. 111-118, 2006.

US EPA –Environmental Protection Agency. Guidelines for reproductibe toxicity risk assessment. **EPA/630/R-96/009**. Washington, 1996.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “Era do teste DL50. **Revista Eletrônica de Farmácia**, n.3, p. 93-8, 2006.

VEIGA JÚNIOR, U.F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: cura segura?, **Química Nova**, v. 28, n.3, 2005.

VIJUALAKSHMI, T., MUTHULAKSHAMI, V.; SACHADANANDAM, S. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with serankottai Nei, a siddha durg-milk extract of *Semecarpus anacardium* Nut. **Journal of Ethnopharmacology** v. 69, n.1, p. 9-15, 2000.

ANEXO A

Solução e preparos

1.0 Solução neutra fosfato tamponada de formol

Formaldeído 37-40%.....100 ml
Água destilada.....900 ml
Fosfato de Na monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....4,0 g
Fosfato de Na dibásico anidro (Na_2HPO_4).....6,5 g