

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

**Toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico das vagens de
Enterolobium contortisiliquum em ratos**

TERESINA

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

**Toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico das vagens de
Enterolobium contortisiliquum em ratos**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Doutoranda: Emanuelle Karine Frota Batista

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

TERESINA


2020

TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO ETANÓLICO DAS
VAGENS DE *ENTEROLOBIUM CONTORTISILIQUUM* EM ROEDORES

EMANUELLE KARINE FROTA BATISTA

Tese aprovada em: 28/02/2020

Banca Examinadora:



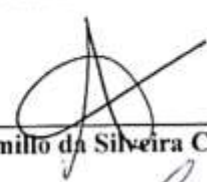
Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Maria Zenaide de Lima Chagas Moreno Fernandes (Interna) /
DBE/CCS/UFPI



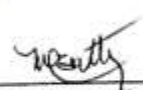
Profa. Dra. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva (Interna) DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Alessandra Camillo da Silveira Castello Branco (Externa) / FSA



Prof. Dr. Francisco das Chagas Araujo Sousa (Externo) / UESPI



Profa. Dra. Maria do Carmo de Souza Batista (Interna) DMV/CCA/UFPI

Agradecimentos

A Deus, que sempre me guiou, abençoando meus passos e permitiu que eu realizasse meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa, agradeço por todo o apoio, disponibilidade, colaboração e comprometimento com o projeto.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva, por toda dedicação, paciência e prazer ao me transferir parte de seu vasto conhecimento.

Aos meus pais, Conceição Frota e José Marinho pela fé depositada, por sempre acreditarem em mim sobre todas as coisas, por sempre estarem próximos em me ajudar.

As minhas irmãs Gabrielle e Izabelle, por verem em mim um grande potencial e por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu amado filho, Benjamin, que nasceu no meio dessa jornada e veio me mostrar o amor verdadeiro, alegrar ainda mais os meus dias e por ser essa pessoinha carinhosa que sempre me recebe com beijos e abraços, aliviando as dificuldades diárias.

Aos amigos Raquel, Ricardo e Eglésia, pelo apoio, carinho, colaboração e pela amizade cultivada nestes anos. Pela presença e força nos momentos difíceis e por me proporcionarem muitos momentos de alegria.

À Ingrid dos Santos, pela amizade e imprescindível parceria laboratorial na execução do trabalho e pelas discussões acadêmicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência animal pela oportunidade, por possibilitar a realização desta importante etapa da minha vida profissional.

À CAPES por ter financiado meus estudos e assim facilitado a realização desta tese.

Aos Professores por aceitarem prontamente meu convite para composição da Banca de Defesa de Tese, sinto-me honrada.

Aos animais que sacrificaram suas vidas e assim contribuíram para a realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente e que tiveram importância na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA.....	vi
LISTA DE QUADRO.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Geral.....	13
1.1.2 Específicos	14
1.2 Estrutura da tese	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Plantas tóxicas de importância pecuária	15
2.2 Toxicidade reprodutiva provocada pela ingestão de plantas.....	16
2.2 <i>Enterolobium contortisiliquum</i> e toxicidade	18
2.3 Avaliação de toxicidade.....	22
2.3.1 Ensaio de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	22
2.3.2 Atividade hemolítica	23
2.3.3 Toxicidade aguda e subaguda	23
2.3.4 Toxicidade reprodutiva	24
CAPÍTULO 1	28
Avaliação fitoquímica e toxicológica dos extratos das vagens de <i>Enterolobium contortisiliquum</i>	28
CAPÍTULO 2	55
Toxicidade reprodutiva do extrato etanólico das vagens de <i>Enterolobium contortisiliquum</i>	55
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURA

Revisão de literatura

Figura 1: a: Folhas, folíolos e foliólulos; b: glândula proeminente; c: flores em cachos; d: fruto de *Enterolobium contortisiliquum*. Fonte: SILVA, 2015.... 19

Capítulo 1

Figura 1: Ratos Wistar apresentando epistaxe após ingestão do extrato etalólico de *Enterolobium contortisiliquum* na dose de 2000 mg/kg. (A) Animal tratado com extrato obtido de Monsenhor Gil; (B) Animal tratado com extrato obtido de Parnaíba..... 40

Figura 2: Fotomicrografia de fígado e rim de ratos tratados agudamente (14 dias) com extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* de Monsenhor Gil (A, B), Teresina (C, D) e Parnaíba (E, F), na dose de 2000 mg/Kg. A, C e E – Fígado; B, D e F – Rim. HE, obj. 20x..... 46

Figura 3: Fotomicrografia de fígado e rim de ratos tratados subagudamente (45 dias) com extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* de Monsenhor Gil – Piauí/Brasil, na dose de 1000 mg/Kg. A – Fígado; B – Rim. HE, obj. 20x..... 47

Capítulo 2

Figura 1: Alterações esqueléticas observadas em fetos de fêmeas tratadas com extrato etanólico de *Enterolobium contortisiliquum* nas doses de 250 mg/Kg (A), 500 mg/Kg (B, C) e 1000 mg/Kg (D, E). A - ossificação incompleta do osso occiptal; B - ossificação incompleta do sacro e ausência de vértebras caudais; C - ossificação incompleta do osso occiptal e aumento de fontanela; D - ossificação incompleta do osso occiptal; E - ossificação incompleta do sacro e vertebras caudais..... 64

LISTA DE QUADRO

Revisão de literatura

Quadro 1: a: Relação das fases do ciclo estral de ratas de acordo com a citologia vaginal..... 25

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Composição fitoquímica dos extratos EtOH dos frutos de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> coletados nos municípios de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí/Brasil.....	36
Tabela 2. Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue do extrato etanólico de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> coletados nos municípios de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí/Brasil.....	37
Tabela 3. Mortalidade média (%) de náuplios de <i>Artemia salina</i> de acordo com as concentrações do extrato etanólico das vagens de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> ($\mu\text{g/mL}$), coletada em Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí, Brasil.....	39
Tabela 4. Efeito da administração aguda (14 dias) do extrato etanólico das vagens de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EEtOH-Ec) de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí/Brasil, no consumo de água, ração e peso de ratos.....	41
Tabela 5. Efeito da administração subaguda (45 dias) do extrato etanólico das vagens de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EEtOH-Ec) obtidas de Monsenhor Gil –Piauí/Brasil, no consumo de água, ração e peso corporal de ratos.....	42
Tabela 6. Análises bioquímicas de ratas após administração aguda (14 dias) do extrato etanólico das vagens de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EEtOH-Ec) de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí/Brasil, nas diferentes doses.....	43
Tabela 7. Peso relativo dos órgãos (%) de ratos tratados agudamente (14 dias) com extrato etanólico das vagens de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EEtOH-Ec) de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí/Brasil.....	44
Tabela 10. Peso relativo dos órgãos (%) de ratos tratados subagudamente (45 dias) com extrato etanólico das vagens de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EEtOH-Ec) de Monsenhor Gil – Piauí/Brasil.....	45

Capítulo 2

Tabela 1: Delineamento experimental do ensaio uterotrófico com extrato etanólico de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> em ratas.....	59
Tabela 2: Número de dias em cada fase do ciclo estral em ratas tratadas com extrato etanólico das vagens de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EEtOH-Ec) nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg durante 45 dias.....	61

Tabela 3: Peso relativo do útero e ovários de ratas Wistar imaturas tratadas com extrato etanólico das vagens de <i>Enterolobium contortisiliquum</i>	62
Tabela 4: Parâmetros reprodutivos de ratas expostas ao extrato etanólico de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> durante o período gestacional.....	63
Tabela 5. Parametros fetais de filhotes de ratas tratadas com extrato etanólico de <i>E. contortisiliquum</i> durante o período gestacional.....	64
Tabela 6. Performance reprodutiva de ratas tratadas com extrato etanólico de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> durante o período gestacional.....	65
Tabela 7: Avaliação do ganho de peso dos filhotes de ratas tratadas com extrato etanólico de <i>E. contortisiliquum</i> durante o período gestacional.....	66
Tabela 8: Avaliação do desenvolvimento físico dos filhotes de ratas tratadas com extrato etanólico de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> durante o período gestacional.....	67
Tabela 9. Avaliação do desenvolvimento sensorial-espacial dos filhotes de ratas tratadas com extrato etanólico de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> durante o período gestacional.....	67
Tabela 10. Avaliação da atividade neuromotora: Locomoção, Levantar e Limpeza dos filhotes de ratas tratadas com extrato etanólico de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> durante o período gestacional.....	68

RESUMO

BATISTA, E. K. F. **Toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* em roedores.** 2020. 96f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2020.

O objetivo deste trabalho foi investigar os componentes fitoquímicos dos extratos etanólico das vagens de *E. contortisiliquum* (EEtOH-Ec) coletados nos municípios de Monsenhor Gil, Parnaíba e Teresina/Piauí-Brasil, bem como avaliar citotoxicidade desses extratos frente a *Artemia salina*, sua atividade hemolítica, toxicidade aguda e subaguda, ação sobre o ciclo estral e possível ação estrogênica e/ou antiestrogênica em ratas, bem como sua toxicidade sobre o período gestacional e desenvolvimento fetal de ratos. Os frutos foram dessecados, triturados, macerados com etanol PA, filtrados, concentrado em evaporador rotativo e liofilizados. Realizaram-se testes fitoquímicos para detecção dos metabolitos secundários. Foi realizado bioensaio frente *Artemia salina* nas doses 1, 10, 100 e 1000 µg/mL e análise da atividade hemolítica em placas de agar-sangue e sangue de carneiro nas doses de 1000 µg/mL e 1000, 500, 250 e 125 µg/mL de EEtOH-Ec das três localidades, respectivamente. Para avaliação da toxicidade aguda utilizaram-se 42 ratos tratados por via oral com EEtOH-Ec das três localidades, nas doses de 300 e 2000 mg/Kg. Para a toxicidade subaguda, ciclo estral, ensaio uterotrófico e gestacional, utilizou-se o EEtOH-Ec de Monsenhor Gil, nas doses de 1000, 500 e 250 mg/Kg. Foram utilizadas 24 ratas Wistar tratadas por 45 dias, para avaliação da toxicidade subaguda e ciclo estral. No teste uterotrófico utilizaram-se 54 ratas imaturas, divididas em nove grupos e tratadas com EEtOH-Ec e estradiol do 21º ao 25º dia pós-natal. Para a avaliação da toxicidade gestacional e fetal foram utilizadas 24 ratas e 12 ratos, em cada teste. Na toxicidade gestacional avaliou-se o tempo de prenhez, sexo dos filhotes, número de filhotes vivos e natimortos, peso da ninhada e desenvolvimento da prole. Na toxicidade fetal as ratas foram anestesiadas no 21º dia de gestação e submetidas a cesariana. Realizou-se a contagem do número de fetos e sítios de implantação, pesagem do útero gravídico, fetos e placenta. Examinou-se os fetos quanto à presença de anomalias. Os resultados foram submetidos a ANOVA seguido pelo Teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Na análise fitoquímica detectaram-se fenóis, taninos catequicos, flavonas, flavovóis, flavanonas, flavanonóis, triterpenos e saponinas. Os EEtOH-Ec das três localidades apresentaram toxicidade frente a *A. salina* e hemólise em ambos os testes analisados. Nos ensaios de toxicidade aguda e subaguda, os animais apresentaram mortalidade, diminuição no consumo de ração e no ganho de peso, e alteração nos parâmetros bioquímicos. Não observaram-se alterações sobre o ciclo estral nem ação estrogênica ou antiestrogênica em ratas. Na toxicidade gestacional, na dose de 500 e 1000 mg/kg houve natimortos. Na toxicidade embriofetal não observou-se alteração no número de fetos e sítios de implantação. Quanto a análise esquelética dos fetos, observou-se um aumento de anomalias nos grupos tratados. Concluiu-se que o EEtOH-Ec apresenta fenóis, taninos catequicos, flavonas, flavovóis, flavanonas, flavanonóis, triterpenos e saponinas. Possui toxicidade frente a *A. salina* e atividade hemolítica, além de toxicidade aguda e subaguda sobre ratos wistar, pois promoveu morte dos animais e alterações nos parâmetros bioquímicos. Causou fetotoxicidade com morte e alterações esqueléticas nos filhotes das ratas tratadas.

Palavras-chave: *Artemia salina*. hemólise. plantas tóxicas. reprodução. Tamboril.

ABSTRACT

BATISTA, E. K. F. *In vitro* and *in vivo* toxicity of the ethanol extract of *Enterolobium contortisiliquum* pods in rodents. 2020. 110f. Thesis (Doctorate in Animal Science) - Postgraduate Program in Animal Science, Federal University of Piauí, Teresina, 2020.

The objective of this work was to investigate the phytochemical components of the ethanolic extracts of *E. contortisiliquum* (EEtOH-Ec) pods collected in the municipalities of Monsenhor Gil, Parnaíba and Teresina/Piauí-Brazil, as well as to evaluate the cytotoxicity of these extracts against *Artemia salina*, its hemolytic activity, acute and subacute toxicity, action on the estrous cycle and possible estrogenic and/or antiestrogenic action in rats, as well as its toxicity on the gestational period and fetal development of rats. The fruits were desiccated, crushed, macerated with ethanol PA, filtered, concentrated on a rotary evaporator and lyophilized. Phytochemical tests were performed to detect secondary metabolites. A bioassay was performed against *Artemia salina* in doses 1, 10, 100 and 1000 µg/mL and analysis of hemolytic activity in blood agar plates and sheep's blood in doses of 1000 µg / mL and 1000, 500, 250 and 125 µg/mL of EEtOH-Ec from the three locations, respectively. For the evaluation of acute toxicity, 42 rats treated orally with EEtOH-Ec from the three locations were used, at doses of 300 and 2000 mg/Kg. For subacute toxicity, estrous cycle, uterotrophic and gestational assays, Monsenhor Gil's EEtOH-Ec was used in doses of 1000, 500 and 250 mg/kg. 24 Wistar rats treated for 45 days were used to assess subacute toxicity and estrous cycle. In the uterotrophic test, 54 immature rats were used, divided into nine groups and treated with EEtOH-Ec and estradiol from the 21st to the 25th postnatal day. For the evaluation of gestational and fetal toxicity, 24 rats and 12 rats were used in each test. In gestational toxicity, pregnancy time, sex of pups, number of live and stillborn puppies, litter weight and development of offspring were evaluated. In fetal toxicity, the rats were anesthetized on the 21st day of pregnancy and underwent cesarean section. Counting the number of fetuses and implantation sites, weighing the pregnant uterus, fetuses and placenta was performed. Fetuses were examined for abnormalities. The results were submitted to ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Phytochemical analysis detected phenols, catechin tannins, flavones, flavovols, flavanones, flavanonols, triterpenes and saponins. The EEtOH-Ec of the three locations showed toxicity against *A. salina* and hemolysis in both tests analyzed. In acute and subacute toxicity tests, animals showed mortality, decreased feed intake and weight gain, and changes in biochemical parameters. There were no changes in the estrous cycle or estrogenic or antiestrogenic action in rats. In gestational toxicity, at the dose of 500 and 1000 mg/kg there were stillbirths. In embryofetal toxicity, there was no change in the number of fetuses and implantation sites. Regarding the skeletal analysis of the fetuses, an increase in anomalies was observed in the treated groups. It was concluded that EEtOH-Ec presents phenols, catechic tannins, flavones, flavovols, flavanones, flavanonols, triterpenes and saponins. It has toxicity against *A. salina* and hemolytic activity, in addition to acute and subacute toxicity on wistar rats, as it promoted death of the animals and alterations in the biochemical parameters. It caused fetotoxicity with death and skeletal changes in the pups of the treated rats.

Keywords: *Artemia salina*. *Enterolobium contortisiliquum*. hemolysis. toxic plants. reproduction. Toxicit.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, há aproximadamente 130 espécies de plantas com toxicidade confirmada para animais de produção em condições de ingestão natural, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Esse dado justifica por que a intoxicação por plantas é a terceira causa mais frequente de mortalidade de bovinos adultos no país. Ficando apenas atrás da raiva transmitida por morcegos hematófagos e do botulismo epizootico secundário à deficiência de fósforo. Outro facilitador é sistema de criação extensivo que favorece maior acesso dos animais às plantas tóxicas e explica, em parte, o número crescente de surtos de intoxicações no país.

Plantas tóxicas de interesse pecuário são definidas como aquelas que quando ingeridas pelos animais de produção, sob condições naturais, são capazes de causar danos à saúde ou mesmo morte destes seres (TOKARNIA et al., 2012; PESSOA et al., 2013). Na pecuária, as ingestões de plantas tóxicas afetam direta e indiretamente a reprodução e produção animal e, conseqüentemente, a condição econômica e social de produtores. As perdas econômicas ocasionadas pelas plantas podem ser classificadas como diretas ou indiretas conforme o impacto que estas representam. As perdas diretas incluem morte de animais, diminuição dos índices reprodutivos (abortos, infertilidade, malformações), redução da produtividade nos animais sobreviventes (diminuição da produção de leite, carne, lã) e aumento da incidência de outras doenças devido depressão imunológica. As perdas indiretas incluem os custos de controle das plantas tóxicas nas pastagens, construção de cercas, pasto alternativo, as medidas de manejo para evitar as intoxicações, compra de gado para substituir os animais mortos, e os gastos associados ao diagnóstico e tratamento das intoxicações (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001).

Várias plantas tóxicas, quando ingeridas, causam dano à saúde dos ruminantes, afetando os diferentes órgãos ou sistemas, inclusive o reprodutivo. As plantas que afetam a reprodução podem ser divididas em abortivas, de ação estrogênica ou antiestrogênicas, e malformações congênitas. No Brasil plantas que são consideradas abortivas para ruminantes, são: *Tetrapteryx* spp, *Ateleia glazioviana* (timbó, maria-preta, cinamomo bravo), *Stryphnodendron obovatum* (barbatimão-da-folha-miúda), *Stryphnodendron coriaceum* (barbatimão, barbatimão-do-Piauí, barbatimão-do-nordeste), *Enterolobium contortisiliquum*, (timbaúva, tamboril), *Aspidosperma*

pyrifolium (pereiro) e *Poincianella pyramidalis* (catingueira) (BENÍCIO et al., 2007; RIET-CORREA et al., 2007; BONEL-RAPOSO et al., 2008; TOKARNIA et al., 2012; CAMPOS; CARRER, 2016; CÂMARA et al., 2017).

No Piauí, dentre as plantas tóxicas que mais causam prejuízos à pecuária pode-se citar o *Enterolobium contortisiliquum*. Essa planta causa intoxicação com sinais digestivos, fotossensibilização e aborto em bovinos. Além disso, foi descrita em caprinos, provocando aborto e diarreia, mas sem fotossensibilização. A *E. contortisiliquum* é conhecida como timbaúva, tamboril ou orelha-de-negro. É uma árvore com ampla distribuição no Brasil (MENDONÇA et al., 2009; LEMOS et al., 2011; LORENZI, 2002; TOKARNIA et al., 2012).

Entretanto, apesar do extensivo estudo e vasta literatura relacionada às plantas tóxicas do Brasil (TOKARNIA et al., 1979; RIET-CORREA et al., 1993; RIET-CORREA et al., 2009; TOKARNIA et al., 2012, MACEDO et al., 2015; REIS et al., 2016; LEAL et al., 2017), ainda há carência de informações relacionadas à forma de como estas são tóxicas, seja pela morte de animais, redução na produção ou interferência na reprodução sob a forma de abortos, sendo desejável obter informações que possam contribuir para seu controle e profilaxia, uma vez que de acordo com os princípios de toxicologia, toda substância poder ser considerada um agente tóxico, dependendo da dose, tempo, frequência e via de administração (BARROS; DAVINO, 2008).

A toxicidade das substâncias pode ser avaliada de forma aguda e crônica através de observações do comportamento, variações no consumo de ração, evolução ponderal, avaliação biométrica dos órgãos e alterações orgânicas visualizáveis macro e microscopicamente. As determinações hematológicas e bioquímicas sanguíneas são fundamentais para prever a influência da substância-teste sobre a homeostase e o estado das funções hepática e renal. A interferência tóxica na capacidade reprodutiva tanto de machos, quanto de fêmeas, incluindo o desenvolvimento pré-natal também pode ser observada sendo referida como toxicidade reprodutiva.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

- Avaliar a toxicidade aguda, subaguda e reprodutiva, e a atividade estrogênica e/ou antiestrogênica do extrato etanólico dos frutos de *Enterolobium*

contortisiliquum provenientes dos municípios de Monsenhor Gil, Parnaíba e Teresina.

1.1.2 Específicos

- Analisar a composição fitoquímica do extrato etanólico do fruto de *E. contortisiliquum* obtidos em Monsenhor Gil, Parnaíba e Teresina;
- Determinar a toxicidade *in vitro* de *E. contortisiliquum* sobre *Artemia salina* e atividade hemolítica;
- Investigar a possível ação estrogênica e/ou antiestrogênica do extrato etanólico do fruto de *E. contortisiliquum* em ratas impúberes;
- Observar e descrever a influência dos frutos de *E. contortisiliquum* sobre o ciclo estral de ratas;
- Avaliar o efeito do extrato etanólico do fruto de *E. contortisiliquum* sobre o período gestacional de ratas Wistar e no desenvolvimento de sua prole;
- Investigar o efeito do extrato etanólico do fruto de *E. contortisiliquum* sobre o desenvolvimento embrionário;

1.2 Estrutura da tese

A Tese está organizada em partes: Introdução, Revisão de Literatura e Considerações Finais, redigidas segundo as normas editoriais do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí e dois capítulos, na forma de artigos científicos submetidos à publicação, assim intitulados: Capítulo I – Avaliação fitoquímica e toxicológica dos extratos das vagens de *Enterolobium contortisiliquum*, redigido segundo as normas da revista Anais da Academia Brasileira de Ciências; Capítulo II - Toxicidade reprodutiva do extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* em ratas, redigido segundo as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas tóxicas de importância pecuária

No Brasil, a principal forma de criação dos animais de produção é a extensiva ou semi-intensiva, o que favorece o acesso dos animais as plantas tóxicas, explicando o aumento no número de registro de surtos de intoxicação por plantas nos animais de produção (PESSOA et al., 2013).

Intoxicações por plantas causam prejuízos econômicos significativos na pecuária em várias regiões do mundo. No Brasil, o número de plantas conhecidas como tóxicas para ruminantes e equinos aumentou consideravelmente nas últimas décadas. Atualmente, são conhecidas cerca de 130 espécies de plantas tóxicas de interesse pecuário no país, sendo que a exposição dos animais de produção a essas plantas ocorre principalmente por sua presença nas pastagens, contaminação acidental do alimento e/ou oferecimento como alimento (DUARTE, 2012; TOKARNIA et al., 2012; PESSOA et al., 2013).

A ingestão de plantas tóxicas afeta de forma direta e indireta a produção e reprodução animal, além da condição econômica e social dos produtores e seus familiares (SOUSA et al., 2014). As perdas econômicas diretas incluem morte dos animais, redução do desempenho reprodutivo (abortos, infertilidade, malformações) e produtivo dos animais sobreviventes (carne, leite ou lã), bem como outras alterações ou doenças intercorrentes, resultantes do aumento da susceptibilidade pela depressão imunológica. Estima-se que as plantas tóxicas promovam mortes anuais de animais em: 800.000 a 1.750.000 bovinos, aproximadamente 400.000 ovinos, 50.000 a 60.000 caprinos e 38.000 equinos (RIET-CORREA et al., 2012; TOKARNIA et al., 2012; PESSOA et al., 2013). As perdas indiretas incluem custos de controle das plantas tóxicas nas pastagens, construção de cercas e pastoreio alternativo para evitar intoxicações, compra de novos animais para recomposição do rebanho, diagnóstico das intoxicações e tratamento dos animais intoxicados. Devem ser consideradas, ainda, a impossibilidade de uso das pastagens e a desvalorização da terra, pela invasão por plantas tóxicas (RIET-CORREA et al., 2012).

As perdas econômicas causadas pelas intoxicações por plantas são difíceis de estimar devido a escassez de dados confiáveis sobre esses fatores. As perdas

causadas por mortes são mais facilmente determinadas através da análise dos dados elaborados por laboratórios de diagnóstico, no entanto, há poucos dados sobre as perdas reprodutivas causadas por abortos, infertilidade e malformações (RIET-CORREA et al., 2012).

2.2 Toxicidade reprodutiva provocada pela ingestão de plantas

A reprodução é um processo cíclico que se divide em etapas: pré e pós-natal, amadurecimento sexual e acasalamento. A exposição de agentes químicos em cada fase pode gerar diversas alterações onde o organismo pode não concluir o desenvolvimento levando a morte, malformações externas e até mutações expressas em gerações sucessivas (BORTOLINI, 2009).

A toxicologia reprodutiva investiga os efeitos adversos produzidos pela exposição de substâncias, naturais ou sintéticas, no organismo a se desenvolver. Os efeitos adversos incluem alterações no sistema reprodutivo, produção e transporte de gameta, ciclo reprodutivo, fertilidade e incidência de partos prematuros. As proles podem ser afetadas pela exposição parental antes da concepção e durante o período do desenvolvimento pré-natal (LEMONICA et al., 2008; OECD, 2015). Sendo assim, os estudos de toxicidade reprodutiva devem contemplar principalmente avaliações nas fases de fertilidade e desenvolvimento embrionário inicial; desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna e desenvolvimento embrio-fetal (BRASIL, 2013).

A perda gestacional pode ocorrer em dois momentos, sendo o primeiro antes da implantação e migração pelos cornos uterinos, denominada mortalidade embrionária ou posteriormente, quando já há fixação de cálcio no esqueleto, chamada de mortalidade fetal (GONÇALVES, 2005). A mortalidade embrionária e fetal pode ser provocada por diferentes agentes infecciosos, como também, por outros fatores que atingem a mãe e o embrião como defeitos genéticos, doenças reprodutivas e fatores que alteram a saúde geral (SOBESTIANSKY et al., 2012; BRIDGES et al., 2013).

A mortalidade embrionária geralmente está associada a repetição de estro com intervalos prolongados, enquanto a mortalidade fetal pode resultar em mumificação fetal, quando não há contaminação bacteriana do ambiente uterino; A mumificação fetal é uma alteração resultante da morte do feto, com a sua reabsorção incompleta ou maceração fetal, quando a morte fetal não é acompanhada de sua expulsão, mas há

invasão bacteriana do ambiente uterino, levando a putrefação dos tecidos moles, restando apenas ossos no lúmen uterino. Contudo, a consequência mais comum de mortalidade fetal em bovinos é o abortamento, caracterizado pela expulsão de um feto inviável antes do final do período normal de gestação (NASCIMENTO; SANTOS, 2011; SANTOS; ALESSI, 2016). A ingestão de plantas que podem induzir o aborto envolve o risco de grave intoxicação, podendo resultar na morte do animal ou em futuras complicações reprodutivas (MOREIRA et al., 2001; ROEHSIG et al., 2011).

Em animais de produção, as plantas que são consideradas abortivas são: jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), o pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*), timbó ou maria-preta (*Ateleia glazioviana*), cipó-ruão ou cipó-preto (*Tetrapteryx acutifolia*), cipó-ferro (*Tetrapteryx multiglandulosa*), cabacinha (*Luffa acutangula*), barbatimão (*Stryphnodendron coriaceum*), barbatimão-da-folha-miúda (*Stryphnodendron obovatum*), tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*), catingueira (*Poincianella pyramidalis*) e melosa (*Stemodia maritima*) (MEDEIROS et al., 2004; RIET-CORREA et al., 2007; SOUZA-LIMA; SOTO-BLANCO, 2010; CÂMARA et al., 2017). Embora algumas destas ainda careçam de investigação científica mais aprofundada. Plantas que acumulam nitrato como capim Johnson (*Sorghum halepense*), sorgo (*Sorghum bicolor*), figueira brava (*Datura stramonium*), girassol (*Helianthus annuus*), caruru (*Amaranthus* spp.) e feno de aveia (*Avena sativa*) também podem causar abortamento em virtude de intoxicação por nitrato-nitrito (PUGH, 2004), bem como plantas ricas em fitoestrógeno, como: *Trifolium* spp (trevos) e *Medicago sativa* (alfafa) (NASCIMENTO; SANTOS, 2011).

Várias plantas afetam de alguma maneira a reprodução animal, e podem ser agrupadas, em função de seus efeitos tóxicos em: plantas de ação teratogênica, aquelas que afetam diretamente o feto, produzindo malformações congênitas; e plantas de ação estrogênica, que contém fitoestrógenos que afetam animais adultos e em desenvolvimento (NUNES et al., 2010).

A teratologia estuda anomalias e malformações que são provocados por perturbações durante o desenvolvimento embrionário e/ou fetal. Esses defeitos podem ser deformidades, displasias ou malformações (HANSEN; YANKOWITZ, 2002). A malformação fetal é uma alteração que pode ser causada pela ação direta de um agente tóxico sobre o feto ou através de ação sobre o organismo materno, provocando formação anormal dos tecidos e anormalidades químicas (BERNARDI, 2017). A ação

de um agente teratogênico na reprodução é variada, podendo provocar aborto, malformações ou retardo do crescimento intrauterino. Sua ação depende de fatores como: estágio do desenvolvimento do conceito, relação dose e efeito, genótipo materno-fetal e mecanismo patogênico específico de cada agente (TORALLES et al., 2009). A malformação fetal não significa apenas formação anormal de tecidos, mas também está associada a anormalidades bioquímicas, podendo ser causadas pela ação direta de um agente tóxico sobre o feto ou através de ação sobre o organismo materno (SÁ, 2014).

As plantas teratogênicas causam problemas fetais e embrionários visíveis e também podem causar abortos, entre estas, encontram-se heléboro-branco (*Veratrum californicum*) e heléboro verde (*V. viride*) e jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) que induzem deformidades craniofaciais em cordeiros (KNIGHT; VALTER, 2004; DANTAS et al., 2012). Outras plantas com potencial teratogênico são cicuta (*Conium maculatum*), tabaco (*Nicotiana* spp.), ervilhaça de leite (*Astragalus* spp.) e algodão de ceda (*Oxytropis* spp.), que induzem múltiplas deformidades ósseas ou contraturas congênitas nas extremidades, especialmente na flexão de carpo, e palato fendido (RODRÍGUEZ; PÉREZ, 2003). Algumas espécies de *Copaifera* possuem ácidos diterpênicos, entre eles o ácido caurenóico, aos quais é atribuída a capacidade de produzir alterações na musculatura lisa do estômago e do útero, bem como de induzir citotoxicidade e embriotoxicidade (COSTA-LOTUFO et al., 2002; CUNHA et al., 2003; TIRAPELLI et al., 2004).

Assim, o impacto negativo causado pelas intoxicações por plantas na pecuária justifica o desenvolvimento nas últimas décadas de um grande número de pesquisas para caracterizar a epidemiologia e desenvolver tecnologias de controle e profilaxia dessas intoxicações (PESSOA et al., 2013).

2.2 *Enterolobium contortisiliquum* e toxicidade

O *E. contortisiliquum* é classificado na divisão Angiospermae, classe Magnoliopsidae, ordem Fabales, família Leguminosae, sub-família Mimosoidae. É popularmente conhecido como “orelha-de-negro”, “timbó”, “tamboril”, “timbaúva”, entre outros. É uma árvore com altura variando de 20 a 35 metros, de tronco grosso (80 a 160 cm), copa ampla e ramificada, florescendo e frutificando na seca, e largamente

distribuída no Brasil (PEREIRA, 1992; CARVALHO, 1994; ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 2002; TOKARNIA et al., 2012).



Figura 1: a: Folhas, folíolos e foliólulos; b: glândula proeminente; c: flores em cachos; d: fruto de *Enterolobium contortisiliquum*. Fonte: SILVA, 2015.

Essa planta tem sido descrita como tóxica para bovinos. A intoxicação ocorre pela ingestão dos frutos que caem espontaneamente ou estão em galhos derrubados pelo vento ou podas, ou em partes mais baixas da planta, ao alcance dos animais. Estes ingerem avidamente grande quantidade de favas dessa planta exclusivamente na época da seca, quando há escassez de forragem nas propriedades, levando o gado a procurar alternativas alimentares no pasto, aumentando as chances de intoxicação pelo tamboril. O período de frutificação é nos meses de agosto a novembro (BASTIANETO et al., 2005; RIET-CORREA et al., 2007; COSTA et al., 2009; SANT'ANA et al., 2014; LEAL et al., 2017; PUPIN et al., 2017). Em aves, a *E. contortisiliquum* causa necrose hepatocelular difusa (GADELHA et al., 2015).

Alguns compostos tóxicos como saponinas triterpênicas bismedesídicas, denominadas de enterolosaponinas A e B (MIMAKI et al., 2003) e contortosiliosides A, B, C, D, E e G (MIMAKI et al., 2004) foram isolados das favas de *E. contortisiliquum*. Destas saponinas, a enterolosaponina A e contortosilioside B apresentaram ação tóxica para macrófagos de rato e contortosilioside A e C resultaram tóxicas para macrófagos de rato e células de linfoma murino. Um composto chamado enterolobina também foi isolado a partir de suas sementes, apresentando atividade hemolítica, citolítica, e pró-inflamatória, sendo considerada por alguns autores como responsável pela atividade

toxica da *E. contortisiliquum* (MIMAKI et al. 2003, 2004; MATOS et a., 2011). No entanto, a ocorrência de lesões causadas pelo pericarpo do fruto demonstra que o provável ingrediente tóxico são as saponinas triterpênicas. As saponinas são glicosídeos frequentemente encontrada em plantas, conhecidos por causar lesões digestivas e hepáticos em várias espécies diferentes (GADELHA et al., 2015). A planta também contém carboidratos altamente fermentáveis (BACHA et al., 2017) e os ovinos alimentados com altas doses de vagens desenvolvem acidose ruminal frequentemente fatal (PUPIN et al., 2017).

As três formas da doença descritas na intoxicação por *E. contortisiliquum* (digestiva, com fotossensibilização e abortiva) (GRECCO et al., 2002; MENDONÇA et al., 2009; LEMOS et al., 2011) têm sido mencionadas como ocorrendo na região nordeste em bovinos (SILVA et al., 2006; ASSIS et al., 2009; MELLO et al., 2010; BEZERRA et al., 2012; OLINDA et al., 2015). A forma digestiva desta intoxicação é causada por acidose e, portanto, a sua ocorrência deve ser associada à ingestão de favas em um curto período de tempo por animais que não estavam ingerindo a planta anteriormente (OLINDA et al., 2015). Os abortos não foram reproduzidos experimentalmente em bovinos. Entretanto, em cobaios (*Cavia porcellus*), a administração, por via oral, do pó das vagens diluídas em água destilada, induziu abortos em animais que não apresentaram sinais clínicos, mas que tinham lesões hepáticas. Nesses animais pode-se observar espessamento endometrial e secreção mucosa na luz endometrial e das trompas uterinas, congestão dos vasos uterinos e regressão de corpo lúteo ovariano, alterações comuns em abortos, independente da sua etiologia (BONEL-RAPOSO et al., 2008).

Em casos espontâneos de intoxicação em bovinos, ocorridos nos Estados de Goiás, Mato Grosso e Rio Grande do Sul foram descritos sinais clínicos caracterizados principalmente por transtornos digestivos, fotossensibilização hepatógena e abortos (GRECCO et al., 2002; MENDONÇA et al., 2009; LEMOS et al., 2011; SANT'ANA et al., 2014). Em casos espontâneos de intoxicação em caprinos, foram relatados transtornos digestivos (diarreia) e aborto (BENÍCIO et al., 2007). Em ovinos há um único caso espontâneo relatado, causando fotossensibilização hepatógena (BEZERRA et al., 2012). A fotossensibilização é uma reação de hipersensibilidade que o animal desenvolve aos raios solares, devido à presença de fileritrina na pele. A fileritrina é um pigmento fluorescente formado nos pré-estômagos de ruminantes a partir da

clorofila, que em casos de lesão hepática, não é eliminada, atingindo a circulação sistêmica e acumulando-se na pele (TOKARNIA et al., 2012).

Os achados necroscópicos dos animais intoxicados por *E. contortisiliquum* caracterizam-se por ascite, edema da parede do intestino delgado com congestão e presença de petéquias, fezes secas com sangue ou muco. Há presença de sementes da planta no rúmen, retículo e abomaso. O fígado apresenta bordos arredondados e com discreta acentuação do padrão lobular na superfície capsular que se aprofundam ao corte em todo o parênquima. Nos rins podem ser observadas áreas com discreto pontilhado esbranquiçado na superfície e ao corte estrias esbranquiçadas, além de vesícula biliar com parede edematosa e com presença de petéquias na mucosa (GRECCO et al., 2002; BENÍCIO et al., 2007; TOKARNIA et al., 2012) .

Na avaliação histopatológica podem ser observadas congestão e hemorragias nos intestinos. Degeneração hidrópica e necrose com formação de vesículas e pústulas intra-epiteliais foram encontradas nas células epiteliais do esôfago, rúmen e retículo. Fígado com presença de edema, hemorragias multifocal, vacuolização de hepatócitos e alterações degenerativas e necrose das células hepáticas observada nas áreas periportal, mediozonais e também na região centrolobular. Rins com vacuolização de células epiteliais e presença de cilindros hialinos nos túbulos renais (GRECCO et al., 2002; DIAS et al., 2011; BACHA, 2012; TOKARNIA et al., 2012; BACHA et al., 2017).

Em cobaios experimentalmente intoxicados, as lesões macroscópicas consistiam de áreas hemorrágicas na camada serosa e mucosa do estômago, intestino delgado e grosso. Além de fígado aumentado e vesícula biliar distendida. As lesões histológicas caracterizaram-se por hemorragia e congestão do baço, rins e intestino, com discreta vacuolização das células epiteliais de túbulos renais, vacuolização e necrose dos hepatócitos periportais (BONEL-RAPOSO et al., 2008).

A profilaxia da intoxicação por *E. contortisiliquum* consiste em não colocar bovinos com fome em currais ou pastos pequenos onde haja grande quantidade de favas acumuladas no chão. Sendo que pequenas quantidades ingeridas durante períodos prolongados não causam intoxicação e sim certa tolerância (TOKARNIA et al., 2012).

2.3 Avaliação de toxicidade

De acordo com a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição. Assim, faz-se necessário conhecer as condições de uso seguro dessas substâncias para a saúde. A toxicidade de uma substância a um ser vivo pode ser considerada como a capacidade de causar dano grave ou morte. A avaliação da toxicidade visa caracterizar os efeitos adversos inerentes a determinado agente químico (CORRÊA et al., 2003). Os testes toxicológicos aplicados em animais de laboratório, sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias em humanos ou animais expostos às mesmas (BARROS, DAVINO, 2008).

Sendo assim, os testes toxicológicos normalmente requeridos *in vivo* incluem ensaios de toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, toxicidade crônica, mutagênese, carcinogênese, reprodução e teratogênese, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea, indução de dependência e ecotoxicidade (SPIELMANN, 2002; VILAS BOAS, 2006; BARROS; DAVINO, 2008; NUGENT; DUNCAN; COLAGIOVANNI, 2013). No entanto, a sociedade atual vem exigindo a redução na utilização de animais para pesquisas científicas, fazendo com que testes *in vitro* sejam cada vez mais empregados. Dentre esses testes pode-se citar o ensaio toxicológico frente à *Artemia salina*, atividade hemolítica e de citotoxicidade (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006).

2.3.1 Ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*

É um dos métodos alternativos bastante utilizados em triagem de substâncias de origem vegetal. A *A. salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em águas salgadas e salinas, sendo utilizado na alimentação de peixes e camarões por seu alto valor nutritivo (ASEM, 2008; FARIAS; IMADA; KATAYAMA, 2010).

O uso desse crustáceo em estudos toxicológicos deve-se a facilidade de manuseio, à rapidez e ao baixo custo. Sendo assim, este crustáceo tem sido utilizado em ensaios de toxicidade desenvolvidos para determinar a condição letal, de compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER et al., 1982; FARIAS; IMADA; KATAYAMA, 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), são

consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de DL₅₀ abaixo de 1000ppm em *A. salina* (MEYER et al., 1982).

2.3.2 Atividade hemolítica

A hemólise caracteriza-se pela ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina. Esta quando encontrada livre no plasma é prejudicial a saúde causando sérios danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração, sendo assim necessário a observação da referida atividade (CARVALHO et al., 2007). Com isso, na triagem de atividades biológicas e toxicológicas de extratos vegetais, faz-se necessária a verificação da atividade hemolítica das espécies estudadas.

Há varias metodologias para a verificação da atividade hemolítica de espécies vegetais. A organização mundial de saúde em seu manual de 1998 preconiza a avaliação qualitativa por observação de coloração vermelha decorrente da liberação de hemoglobina (OMS, 1998). Outra alternativa é o método de observação de formação de halos de hemólise em placas de ágar sangue (EFING, 2008). Uma técnica recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária recomenda a observação de absorvância em ultra-violeta, sendo este um teste exigido no Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos (ANVISA, 2003).

2.3.3 Toxicidade aguda e subaguda

A avaliação de toxicidade aguda tem por finalidade classificar e rotular substancias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados, como o potencial tóxico em órgãos específicos, os indicativos sobre a toxicocinética e mecanismos de ação e o estabelecimento das doses para estudos complementares de toxicidade. O teste de toxicidade oral subaguda permite observar por um longo período de tempo se o produto testado causa efeitos tóxicos (VALADARES, 2006). A duração de exposição (28 dias) foi definida em função do que se pretende em termos de uso clínico do medicamento, de acordo com as diretrizes para estudo da toxicidade oral de doses repetidas de substâncias químicas da OECD 407 (2008).

A toxicidade sistêmica de determinada substância pode se manifestar por meio da redução do desenvolvimento ponderal, além da redução nos consumos de água e

ração, apatia, alteração comportamental, má condição de pelagem e alteração da massa relativa dos órgãos (MELO, 2001; GONZÁLEZ; SILVA, 2003).

As mudanças no consumo de ração, água e massa corpórea são importantes indicadores na avaliação da toxicidade de compostos ou preparações (BAILEY et al., 2004). O peso corporal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal (PIRES JUNIOR et al., 2012). As determinações hematológicas e bioquímicas sanguíneas são fundamentais para prever a influência da substância-teste sobre a homeostase e o estado das funções hepática e renal (OECD, 2008).

2.3.4 Toxicidade reprodutiva

A toxicidade reprodutiva refere-se à interferência tóxica ao sistema reprodutor em qualquer espécie de capacidade reprodutiva tanto de machos quanto de fêmeas, incluindo o desenvolvimento pré-natal (SANTOS, 2009; BARROS, 2011).

O estudo avaliativo da toxicologia reprodutiva visa esclarecer os efeitos adversos produzidos pela exposição de fármacos, sejam elas naturais ou sintéticas, no organismo a se desenvolver. Esses estudos são divididos em três segmentos: período perinatal, que inicia antes da concepção; período pré-natal, que inicia na concepção e termina na lactação; e período neonatal, que inicia com o parto e se estende até o início das características sexuais secundárias (LEMONICA et al., 2008; HOLENBACH et al., 2010; BERNARDI, 2017). A exposição de agentes químicos em cada fase pode gerar diversas alterações onde o organismo pode não concluir o desenvolvimento levando a morte, malformações externas e até mutações expressas em gerações sucessivas (BORTOLINI, 2009).

Acreditava-se que após a fecundação o conceito seria totalmente protegido pelo útero materno e a placenta seria uma barreira inviolável a qualquer agente externo, atualmente sabe-se que o embrião/feto pode sofrer influências de agentes externos físicos, biológicos e químicos, capazes de provocar alterações no desenvolvimento do embrião/feto, que variam de acordo com o período de gestação em que ocorre a exposição materna (LEMONICA et al., 2008).


Os ratos, camundongos e coelhos são animais de escolha para sustentar os

testes laboratoriais, pois reúnem diversas características como: período curto de gestação, prole numerosa, útero com dois cornos, nos quais o sítio de implantação tem distribuição regular e placenta tipo hemocorial, como os humanos (MELLO; LANGELOH, 2006).

2.3.4.1 Avaliação do ciclo estral

Devido ao curto período de duração do ciclo estral de ratas, com média de quatro ou cinco dias, estas constituem um bom modelo para o estudo das alterações que ocorrem durante o ciclo reprodutivo. O uso de roedores em pesquisas científicas deve-se, principalmente, ao fato de ser um animal pequeno, muito prolífero (8 a 15 filhotes), ter período de gestação curto (20 a 23 dias), ser de fácil domesticação e manutenção e a alta possibilidade de procriação com expectativa de vida de 2,5 anos (USHIRDBIRA, 2015).

O ciclo estral de ratas é caracterizado por quatro fases determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal, a saber: proestro – apresenta grande número de células arredondadas com aparência granular dispostas em grupos ou alinhadas como em fio; estro – células queratinizadas semelhantes a agulhas, podendo estar dobradas e com borda irregular pontiaguda; metaestro – células pavimentadas dobradas e pouco número de leucócitos; diestro – há predominância de leucócitos, muco e poucas células epiteliais dobradas (figura 2) (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; VANONI, 2006; GOLDMAN et al., 2007; FORTES, 2010).

	Metaestro	Diestro	Proestro	Estro
Fase	Transitória	Pré-ovulatória	Ovulatória	Pós- ovulatória
Duração	6-8 horas	55-57 horas	12-14 horas	25-27 horas
Características	Igual proporção das diferentes células	Predomínio de leucócitos	Predomínio de células nucleadas	Predomínio de células não nucleadas (queratinizadas)
Ilustração das células predominantes				
Efeito	Progesterônico		Estrogênico	

Quadro 1: Relação das fases do ciclo estral de ratas de acordo com a citologia vaginal. Fonte: MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; PINTO, 2016.

O ciclo estral envolve mudanças histológicas, fisiológicas, morfológicas e bioquímicas no ovário. Durante o ciclo estral, a maturação e ovulação do folículo pré-ovulatório ocorre sob influência de hormônios ovarianos e extraovarianos. Alguma alteração nesses hormônios leva a irregularidade na função do ovário e mudança na duração das fases do ciclo estral (SHIVALINGAPPA et al., 2002).

A avaliação de células vaginais é o método mais preciso para a identificação de todas as fases do ciclo estral, entretanto, é relativamente trabalhosa, havendo a necessidade de coletar as células vaginais e transferi-las para uma lâmina de vidro onde possam ser visualizadas. Esse método é utilizado quando todas as quatro fases do ciclo estral precisam ser identificadas (BYERS et al., 2012).

2.3.4.2 Ensaio uterotrófico

O teste uterotrófico pode ser utilizado para detecção de substâncias com efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos (OECD, 2007). É um ensaio de curta duração, que apresenta boa especificidade e sensibilidade (US EPA, 1996). Esse teste consiste em quantificar modificações de peso e epitélio uterino em ratas imaturas ou ooforectomizadas após tratamento com a substância avaliada por período de 3-4 dias (EDSTAC, 1998; ANDRADE et al., 2002). A sensibilidade deste ensaio se baseia no uso de animais cujo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é afuncional, o que leva a baixos níveis endógenos de estrogênio circulante. Isto assegura um baixo peso uterino inicial e um alcance máximo de resposta às substâncias estrogênicas administradas. Se alguma substância estimular, direta ou indiretamente, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal precocemente, pode resultar em puberdade, ovulação e abertura vaginal precoce (OECD, 2007).

2.3.4.3 Avaliação gestacional

O período gestacional inclui pré-implantação, implantação, pós-implantação, organogênese e período fetal. Em ratos o período de pré-implantação e implantação ocorrem entre os dias 3 a 4 e 5 a 6 após a fertilização, respectivamente (SALMAN et al., 2009). As condições hormonais maternas são necessárias para o bom desenvolvimento embrionário, sendo que os níveis sanguíneos de progesterona inadequados interferem com a viabilidade do embrião, não permitindo que o

endométrio esteja preparado para a sustentação da gestação. Assim os corpos lúteos, responsáveis pela secreção de progesterona, encontram-se aumentados de volume durante a gestação (NEPOMUCENO et al., 2005).

Em determinadas fases do período gestacional a ingestão de substâncias 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 embrionário (BERNARDI, 2006; NAVA; ROMAN, 2010).

Agentes citotóxicos interrompem a gestação provavelmente interferindo na divisão mitótica dos fetos, e as substâncias químicas interferem antes e após o processo de implantação, podendo haver perda embrionária pré e pós-implantação (YAKUBU; BUKOYE, 2009). A morte do embrião após a implantação é observada como reabsorção fetal, indicando falha no desenvolvimento do embrião devido ao mal funcionamento do revestimento uterino ou toxicidade materna, que pode aumentar a reabsorção fetal e provocar morte tardia. O aumento de perda pós-implante sugere efeito anti-implantação e enfatiza propriedades abortivas e de reabsorção fetal (MAGANHA et al., 2006; YAKUBU; BUKOYE, 2009).

CAPÍTULO 1

Avaliação fitoquímica e toxicológica dos extratos das vagens de *Enterolobium contortisiliquum*

Formatado de acordo com as normas da revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.

Avaliação fitoquímica e toxicológica dos extratos das vagens de *Enterolobium contortisiliquum*

Emanuelle Karine Frota Batista^{1*}, Ingrid dos Santos Faria¹, Ricardo de Araujo¹, Herbert Gonzaga Sousa², Brenda Nayanne Gomes dos Santos³, Janylla Mirck Guerra de Oliveira⁴, Mariana Helena Chaves⁵, Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva¹, Amilton Paulo Raposo Costa¹

¹ Laboratório de Patologia Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Min. Petronio Portella, Av. Universitária s/nº CEP: 64049-550 – Teresina, PI.

*e-mail: emanuellefrota@yahoo.com.br

² Universidade Estadual do Piauí (UESPI) - Programa de Pós-Graduação em Química – Campus Pirajá, R. João Cabral - Matinha, Teresina - PI, 64002-150.

³ Laboratório de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo. Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Min. Petronio Portella, Av. Universitária s/nº CEP: 64049-550 – Teresina, PI.

⁴ Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Avenida Manoel Gracindo, Km 01, S/n - Planalto Horizonte, Bom Jesus - PI, 64900-000

⁵ Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí – UFPI. Campus Ministro Petrônio Portela – Teresina, PI

Palavras-chave: *Artemia salina*, *Enterolobium contortisiliquum*, hemólise. plantas tóxicas, prospecção.

Seção: Ciências da saúde

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar os componentes fitoquímicos, toxicidade frente *Artemia salina* e hemolítica. Bom como toxicidade aguda e subaguda em ratos dos extratos etanólico das vagens de *E. contortisiliquum* colado nos municípios de Monsenhor Gil, Parnaíba e Teresina/Piauí-Brasil. Para avaliação da toxicidade aguda foram utilizados 42 ratos tratados por via oral com EEtOH-Ec das três localidades, nas doses de 300 e 2000 mg/Kg. Para toxicidade subaguda foram utilizadas 24 ratas tratadas, via oral, com EEtOH-Ec de Monsenhor Gil, nas doses de 1000, 500 e 250 mg/Kg. Os resultados foram submetidos a ANOVA seguido pelo Teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Na análise fitoquímica dos extratos observou-se a presença de fenóis, taninos catequicos, flavonas, flavovóis, flavanonas, flavanonóis, triterpenos e saponinas. Os EEtOH-Ec das três localidades apresentaram toxicidade frente a *A. salina* e hemólise em ambos os testes analisados. Nos ensaios de toxicidade aguda e subaguda, os extratos mostraram-se tóxicos aos animais que apresentaram mortalidade, diminuição no consumo de ração e no ganho de peso, além de alteração nos parâmetros bioquímicos. Concluiu-se que o EEtOH-Ec possui fenóis, taninos catequicos, flavonas, flavovóis, flavanonas, flavanonóis, triterpenos e saponinas. Este extrato apresentou toxicidade no bioensaio com *A. salina*, nos ensaios de atividade hemolítica, assim como nos ensaios de toxicidade aguda e subaguda, nos quais promovera morte dos animais e alterações nos parâmetros bioquímicos.

INTRODUÇÃO

As plantas produzem diversos metabólitos secundários (saponinas, antraquinonas, alcaloides, taninos, flavonoides, terpenos, entre outros) que podem sofrer variações na produção devido a fatores como: tipo de cultivo, nível de pluviosidade e insolação, tipo de solo, e outros que dependem das características climáticas-edáficas. Fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, ataques de patógenos, podem coordenar ou alterar a taxa de produção dos metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes 2007; Saúde-Guimarães et al. 2007; Barbosa-Filho et al. 2008).

A *Enterolobium contortisiliquum* (Leg. Mimosoideae) é uma árvore amplamente distribuída no Brasil e conhecida como timbaúba, tamboril, tamboril-da-mata e ximbuva (Purisco e Lemos 2008; Tokarnia et al. 2012). A ingestão espontânea das vagens de *E. contortisiliquum* provoca distúrbios gastrointestinais agudos, como diarreia e atonia ruminal, além de anorexia, apatia, desidratação, taquipnéia, abortos e fotodermatite em ruminantes (Tokarnia et al. 2012; Olinda et al. 2015; Bacha et al. 2017). Os surtos ocorreram entre os meses de julho e setembro, época que coincide com a maturação e queda das vagens (Souza et al. 2015). Estudos fitoquímicos verificaram a presença de saponinas triterpênicas nas sementes e frutos de *E. contortisiliquum*, principalmente enterolosaponina A e contortisiliosídeo B, que são tóxicos para macrófagos e contortisiliosídeos A e C, tóxicos para macrófagos e células de linfoma murino (Mimaki et al. 2003, 2004).

Na triagem em busca de plantas que possuam efeitos tóxicos os estudos toxicológicos *in vitro* apresentam-se como uma opção vantajosa; pois além de diminuir custos e obter respostas rápidas, possibilitam a identificação preliminar de plantas com potencial efeito tóxico e permitem a redução dos animais utilizados na experimentação (Bednarczuk et al. 2010). Muitos testes são utilizados para avaliar a toxicidade sistêmica aguda dos animais, e também para classificar e rotular apropriadamente substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade (Lopes 2006).

A partir destas considerações, o objetivo desta pesquisa foi investigar os componentes fitoquímicos e avaliar a atividade citotóxica frente *Artemia salina* e atividade hemolítica, assim

como avaliar a toxicidade aguda e subaguda dos extratos etanólico das vagens de *E. contortisiliquum* obtidos de Monsenhor Gil, Parnaíba e Teresina – Piauí/Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Processamento do material vegetal

Os frutos de *Enterolobium contortisiliquum* foram coletados em propriedades nos municípios de Monsenhor Gil, Parnaíba e Teresina – Piauí/ Brasil, entre os meses de setembro e outubro. Após a identificação da espécie, a exsicata foi depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí – UFPI, sob o número 31198.

O material vegetal de cada localidade foi dessecado em estufa de circulação de ar forçada por sete dias a uma temperatura máxima de 45°C e, em seguida, triturados em moinho. Os extratos etanólico foram obtidos através de maceração a frio, com etanol, após quatro extrações sucessivas. Posteriormente, estes foram filtrados através de papel de filtro e concentrado em evaporador rotativo (Quimis 344B2) a 40°C. O material obtido foi liofilizado e conservado à temperatura de 4-8 °C.

Prospecção fitoquímica dos EEtOH-Ec

Os testes qualitativos para detecção dos constituintes do metabolismo secundário foram realizados por meio de reações gerais, segundo metodologia adaptada (Matos 2009, Costa et al. 2011).

Uma alíquota de 1,0 g de cada extrato etanólico de *E. contortisiliquum* (EEtOH-Ec) foi solubilizada em uma mistura de EtOH/H₂O (8:2) obtendo-se um volume de 100 mL. A solução hidroalcoólica dos extratos foi utilizada nos testes fitoquímicos para a análise de: fenóis, taninos, flavonoides, leucocianidinas, flavonas, flavonóis, flavononas, flavononóis, xantonas, triterpenos, saponinas e alcaloides.

Atividade hemolítica do EEtOH-Ec

O EEtOH-Ec foi submetido a dois ensaios de atividades hemolíticas. No primeiro, foram utilizadas placas de ágar-sangue (Newprov®). As amostras foram preparadas a 1.000 µg/mL, sendo aplicados 20 µL dessa amostra impregnadas em discos estéreis nº 1 com 7 mm de diâmetro (Whatmann®). Discos impregnados com o solvente foram utilizados como controle negativo, e o Triton X-100 a 1.000 µg/mL como um controle positivo. Depois da evaporação dos solventes, os discos foram distribuídos nas placas, que foram incubadas a 36°C por 24 horas. Após este período verificou-se a formação de halo de hemólise. Os halos foram então medidos e os resultados expressos como média dos halos encontrados em triplicata (Kalegari et al. 2011).

O segundo ensaio seguiu metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (Brasil 2010) com adaptações. Para este método preparou-se, com sangue de carneiro desfibrinado (Newprov®), uma suspensão a 2% em tampão fosfato pH 7,4. Os EEtOH-Ec obtidos de cada município foram testados em concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL. Um mL da suspensão de sangue foi adicionado a cada amostra e homogeneizadas, seguido de repouso por 30 minutos. Decorrido este tempo, foram homogeneizadas novamente e mantidas em repouso durante mais 150 minutos e centrifugadas. A água destilada foi utilizada como controle positivo e tampão fosfato como controle negativo. Então foi verificada a formação hemólise total (solução límpida, vermelha e sem a formação de depósito de eritrócitos no tubo). O resultado foi descrito como presença ou ausência de hemólise baseado na tonalidade do sobrenadante após centrifugação. A presença de um precipitado de glóbulos vermelhos indicou resultado negativo.

Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

Para a análise da toxicidade aguda frente *A. salina*, foi utilizada a metodologia de Meyer et al. 1982, adaptada. Os cistos de *A. salina* foram incubados em água do mar artificial na concentração de 0,5 mg/mL, mantida sob aeração e agitação constantes, entre 26 a 30 °C, iluminação de 20 W e o pH entre 8 a 9, por 48 horas para a eclosão dos mesmos. Após a eclosão dos cistos, 10 larvas de *A. salina* foram transferidas para tubos contendo água artificial do mar, com extrato etanólico das vagens de *E. contortisiliquum* (EEtOH-Ec) de Monsenhor Gil, Teresina e

Parbaíba, nas seguintes concentrações: 1, 10, 100 e 1000 µg/mL, em triplicata. Foi utilizado água do mar artificial como controle negativo. Os náuplios foram incubados por 24 horas e decorrido este período de contato, os sobreviventes foram contados. Foram consideradas mortas aquelas larvas que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos. Só foram considerados válidos os testes nos quais o controle apresentou uma mortalidade igual ou inferior a 10% da população.

Ensaio *in vivo* de toxicidade em ratos Wistar

Os procedimentos adotados nos testes de toxicidade aguda e subaguda foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI, conforme parecer nº 57/15. Foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) mantidos em ambiente climatizado (24±1 °C), com ciclo claro-escuro de 12 h.

O protocolo de toxicidade aguda foi desenvolvido conforme o Guia OECD 423 (OECD, 2001). Foram utilizados 42 ratos Wistar (n=6, machos e fêmeas), mantidos em jejum sólido por 18h e depois tratados por via oral com EEtOH-Ec de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba, nas doses de 300 e 2000 mg/Kg em um volume de 10 mL/Kg. Os animais do grupo controle receberam água destilada, por via oral, no volume de 10 mL/Kg. Após o tratamento, realizou-se a observação clínica dos animais a cada 30 minutos durante as primeiras 4h e, depois, diariamente até o 14º dia, sendo avaliados os seguintes parâmetros: morte, estado de alerta, sedação, ptose, dispneia, micção, diarreia, convulsão, atividade motora espontânea, reflexo postural, piloereção, resposta ao tato, dentre outros. A pesagem corporal foi realizada a cada três dias, e a mensuração do consumo de água e ração foi realizada diariamente. O número de mortos foi quantificado por todo o período.

O protocolo de toxicidade subaguda foi desenvolvido conforme o Guia OECD-407/2008 (OECD, 2008). Nesse protocolo foi utilizado apenas o EEtOH-Ec de Monsenhor Gil, pois nesse município havia relatos recentes de morte de 35 caprinos pela ingestão das favas de tamboril. Por ocasião da intoxicação eles apresentavam falta de apetite, apatia, e ao movimentarem-se o quadro se agravava, com gemidos seguidos de morte, indicando a toxicidade do tamboril nessa região.

Foram utilizadas 24 ratas *Wistar* divididas em 4 grupos e tratadas com extrato etanólico de *E. contortisiliquum* (EEtOH-Ec), via oral, nas doses de 1000, 500 e 250 mg/Kg, e água destilada (controle) no volume de 10 ml/kg por um período de 45 dias. Nesse período foi realizada diariamente a mensuração do consumo individual de água e ração e avaliação comportamental, e o ganho de peso foi registrado a cada três dias.

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados e realizada coleta de sangue por punção intracardíaca para avaliação bioquímica dos seguintes parâmetros séricos: Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), uréia, creatinina. Em seguida foram eutanasiados, foram removidos e dissecados o fígado, baço, rins, coração, pulmão, estômago e intestinos delgado e grosso. A massa de cada órgão foi mensurada e comparada a massa corporal de cada animal para cálculo da massa relativa. Fragmentos dos órgãos fixados em formalina tamponada posteriormente foram submetidos ao processamento histopatológico e corados com hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio de luz (Bacha e Wood 1990).

A seguir, para determinar os possíveis efeitos tóxicos no trato digestivo, foram feitas as medições da altura do epitélio do estômago, intestino delgado e intestino grosso, a partir de lâminas em um microscópio de luz (Leica DM1000), equipado com uma câmera digital de alta resolução (Leica DFC320), ligado a um computador com um programa de captação de imagem. Foram selecionadas quatro seções longitudinais claras e contadas para cada grupo avaliado. Todas as medidas morfométricas foram feitas com o software de análise Leica QWin.

Análise Estatística

Os resultados dos testes *in vitro* foram expressos por média \pm desvio padrão, analisados de forma independente. Os ensaios foram analisados estatisticamente por ANOVA - One-way - seguido de aplicação do teste Tukey utilizando o programa Graph Pad Prism versão 5.0. As diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Os resultados dos testes de toxicidade aguda e subaguda foram expressos em média \pm erro padrão da média, e analisados estatisticamente utilizando o teste de Análise de variância (ANOVA). As diferenças foram avaliadas pelo Teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Prospecção fitoquímica dos EEtOH-Ec

A análise fitoquímica do extrato etanólico das vagens de *E. contortisiliquum*, das diferentes localidades, apresentou os grupos relacionados abaixo (Tabela I).

Tabela I. Composição fitoquímica dos extratos EtOH dos frutos de *Enterolobium contortisiliquum* coletados nos municípios de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí/Brasil

Testes	EtOH - Monsenhor Gil	EtOH - Teresina	EtOH - Parnaíba
Fenóis	++	++	++
Taninos hidrolisáveis	-	-	-
Taninos catéquicos	++	+	++
Flavonas	++	++	++
Flavonóis	++	++	++
Flavanonas	++	++	++
Flavanonóis	++	++	++
Xantonas	+	-	+
Chalconas e auronas	-	-	-
Triterpenos pentacíclicos	+	+	+
Heterosídeos saponínicos	+++	+++	+++
Alcaloides	-	-	-

Forte: (+++); Médio: (++); Fraco: (+); Ausente: (-).

De modo geral, a presença de metabólitos secundários encontrados na análise fitoquímica dos EEtOH-Ec está de acordo com Silveira et al. (2017), que descreveram a presença de flavonas, flavonóis, xantonas, flavanonóis, chalconas, auronas, flavonas e taninos catequicos. A variação fitoquímica de uma mesma espécie analisada poder ser justificada por meio das partes estudadas, bem como dependente do local que o material vegetal é cultivado (Chan-Blanco et al. 2006, Deng et al. 2010). Fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitudes, poluição atmosférica, ataques de patógenos, podem coordenar ou alterar a taxa de produção dos metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes 2007).

Atividade hemolítica do EEtOH-Ec

Esse estudo evidenciou a presença de metabólitos secundários que podem estar relacionados à determinados distúrbios patológicos. O efeito hemolítico pode resultar de diferentes

alterações físicas e bioquímicas na estrutura da hemácia, como solubilização ou alteração da permeabilidade da membrana (Aparicio et al. 2005). A hemólise consiste na ruptura da membrana de eritrócitos, provocando a liberação de hemoglobina no plasma, o que pode causar danos aos rins (nefrotoxicidade) e ao coração (efeito vasomotor). Processos hemolíticos liberam ions potássio no meio extracelular e seu rápido aumento pode levar a parada cardíaca e morte (Carvalho et al. 2007; Alves, 2009). Sendo assim, é necessária a observação da atividade hemolítica na triagem de atividades biológicas e toxicológicas de extratos vegetais (Bednarczuk et al. 2010, Davanço et al. 2014).

Com relação aos resultados obtidos nos ensaios de atividade hemolítica, as diferentes amostras do EEtOH-Ec apresentaram hemólise em ambos os testes analisados. No teste onde foi utilizada a suspensão de células sanguíneas foi observada coloração vermelha sem presença precipitado de células nas duas concentrações de todos os extratos, demonstrando que as amostras testadas promoveram a hemólise. Estes resultados foram confirmados pelo método de difusão em ágar, em que houve a formação do halo de hemólise (Tabela IV).

Tabela II. Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue do extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* coletados nos municípios de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí/Brasil

TRATAMENTO	Halo hemolítico (cm)
Controle negativo	0,0
Controle positivo	22,0±0,58 a
EEtOH-Ec Monsenhir Gil	17,23±0,88 ab
EEtOH-Ec Teresina	9,0±0,62 abc
EEtOH-Ec Parnaíba	10,0±0,75 abc

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de Tukey, $p < 0,05$. a – quando difere do grupo controle negativo; b - quando difere do grupo controle positivo; c - quando difere do grupo EEtOH-Ec Monsenhir Gil.

O EEtOH-Ec de Monsenhor Gil apresentou um halo hemolítico maior que os observados nos extratos de Teresina e Parbaíba. As saponinas apresentam ação sobre a membrana das células sanguíneas causando hemólise, pois interagem com membranas lipídicas de células e formam complexos insolúveis com o colesterol e esteroides da membrana celular, além de alterarem carboidratos da superfície celular, levando à formação de poros, permeabilização das células e perda de hemoglobina no meio extracelular (Gauthier et al. 2009; Muller et al. 2012).

Várias saponinas triterpenóides foram identificadas nas sementes e frutos de *E. contortisiliquum*, principalmente enterolosaponina A e contortisiliosídeo B, que são tóxicos para macrófagos e contortisiliosídeos A e C, que são tóxicos tanto para macrófagos quanto para células de linfoma murino (Mimaki et al. 2003, 2004). Outras saponinas que foram identificadas em *E. contortisiliquum* incluem enterolosaponina B, contortisiliosídeos D e G e enterolobina (Castro-Faria-Neto et al. 1991, Mimaki et al. 2003, 2004). O último é uma proteína hemolítica, citolítica e pró-inflamatória (Castro-Faria-Neto et al. 1991). Substâncias fenólicas também podem causar hemólise por promoverem a oxidação da hemoglobina (Bukowska e Kowalska 2004).

Ensaio de toxicidade com *Artemia salina*

Outro método amplamente utilizado para avaliação da fitotoxicidade, é o teste com *Artemia salina*, que foi desenvolvido para detectar compostos ativos em extratos vegetais (Silva et al. 2005), mas que pode ser utilizado para expressar a toxicidade aguda de um extrato (Lima et al. 2002).

O extrato das vagens coletadas em Monsenhor Gil apresentou toxicidade nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL, durante as primeiras 24 horas de exposição (Tabela IV). Os extratos das vagens de *E. contortisiliquum* de Teresina e Parbaíba apresentaram toxicidade nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL. Corroborando com os resultados da atividade hemolítica. Todas as doses analisadas apresentaram diferença significativa entre si e com relação ao controle negativo, com 100% de mortalidade de náuplios de *A. salina* na maior dose analisada evidenciando a ação tóxica do EEtOH-Ec. A análise do ensaio testado conferiu para o CL50 para o EEtOH-Ec foi a partir de 10 µg/mL. De acordo com Nguta et al. (2011), tanto extratos orgânicos, quanto extratos aquosos com valores de CL50 menores que 100 µg/mL apresentam alta toxicidade. Sendo assim, o EEtOH-Ec, coletado em diferentes localidades no estado do Piauí, mostrou atividade tóxica frente o microcrustáceo *A. salina*.

Tabela III. Mortalidade média (%) de náuplios de *A. salina* de acordo com as concentrações do extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* ($\mu\text{g/mL}$), coletada em Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí, Brasil

CONCENTRAÇÃO	EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Enterolobium contortisiliquum</i>		
	Monsenhir Gil	Teresina	Parnaíba
Controle negativo	13,05	13,05	13,05
1,0	38,25a	6,5	0
10,0	51,07 a	30ab	10ab
100,0	72,44 ab	70 abc	70 abc
1000,0	100,0 abc	100 abc	100 abc

Resultados expressos em média \pm E.P.M. ANOVA seguida de Tukey, $p < 0,05$. a – diferença estatística significativa em relação grupo controle, b – diferença em relação ao grupo 1 $\mu\text{g/mL}$, c – diferença em relação ao grupo 10 $\mu\text{g/mL}$.

O ensaio com *A. salina* mimetiza eficientemente análises citotóxicas em linhagens de células humanas (Meyer 1982). Esse teste permite a avaliação da toxicidade geral, sendo considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (Parra et al. 2001). É usado para avaliar a toxicidade aguda, é considerado um ensaio preliminar no estudo de compostos com potenciais atividades biológicas, apresentando praticidade de manuseio e cultivo, sendo um método rápido e barato (Carvalho et al. 2009; Paula et al. 2014).

Ensaio *in vivo* de Toxicidade aguda e subaguda em ratos Wistar

Com relação a avaliação da toxicidade aguda dos EEtOH-Ec oriundos de três localidades, foi observada mortalidade nos grupos tratados com a dose de 2000 mg/kg, com quatro óbitos no grupo tratado com o extrato de Monsenhor Gil, dois óbitos no grupo tratado com extrato de Teresina e quatro óbitos no grupo tratado com extrato de Parnaíba. Quanto ao *screening* hipocrático, a administração dos EEtOH-Ec de Monsenhor Gil e Parnaíba, nas doses de 300 e 2000 mg/kg, promoveu alterações comportamentais e clínicas dos animais dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle, tendo sido observados sinais clínicos de toxicidade, caracterizadas por diarreia, dispnéia, piloereção, andar rígido, coçar focinho, lacrimação e epistaxe (Figura 1).

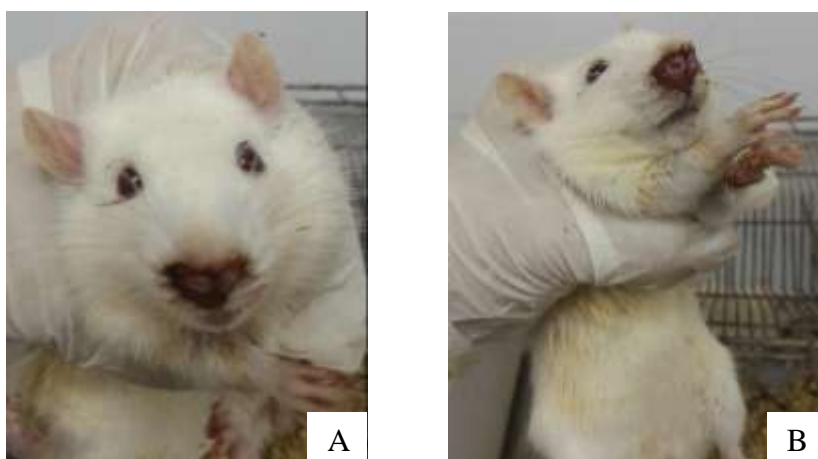


Figura I. Ratos Wistar apresentando epistaxe após ingestão do extrato etalólico de *Enterolobium contortisiliquum* na dose de 2000 mg/kg. (A) Animal tratado com extrato obtido de Monsenhor Gil; (B) Animal tratado com extrato obtido de Parnaíba.

Os resultados demonstram diminuição no consumo de água nos animais tratados com EEtOH-Ec de Teresina e Parnaíba. Todos os grupos tratados apresentaram diminuição no consumo de ração quando comparados ao controle, havendo também redução no ganho de peso desses animais. Esta foi mais acentuada no grupo tratado com EEtOH-Ec de Monsenhor Gil, seguido do grupo tratado com EEtOH-Ec de Parnaíba e Teresina (Tabela V). Os efeitos tóxicos aqui observados podem estar associados à presença de saponinas, confirmada pelo teste de espuma, que revelou um teor de saponinas maior no extrato de Monsenhor Gil, seguido pelo extrato de Parnaíba e Teresina. A toxicidade sistêmica de determinada substância pode se manifestar, por meio da redução nos consumos de água e ração, alteração comportamental, apatia, má condição de pelagem e alteração da massa relativa dos órgãos (Mello 2005, Pires-Júnior et al. 2012).

Tabela IV. Efeito da administração aguda (14 dias) do extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* (EEtOH-Ec) de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí/Brasil, no consumo de água, ração e peso de ratos

Grupo	Dose mg/Kg	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso corporal		Ganho de peso (g)
				Dia 1	Dia 14	
Controle		412,5±51,54	310,3±28,52	284,7±7,19	292,6±1,24	7,9
EEtOH-Ec (Monsenhor Gil)	300	487,5±31,46	280,4±11,63	294,2±22,92	254,8±5,52	-39,4
	2000	495,0±43,68	99,45±19,74ab	293,7±18,69	247,6±7,15	-46,1
EEtOH-Ec (Teresina)	300	247,0±29,22 bc	251,9±16,71c	269,8±25,63	261,9±9,80	-7,9
	2000	287,1±48,70 bc	275,8±20,95c	290,3±24,59	275,8±20,95	-14,4
EEtOH-Ec (Parnaíba)	300	278,0±11,47 bc	267,2±29,40c	285,9±26,80	267,2±29,40	-18,7
	2000	148,0±51,13abc	212,4±59,10c	252,2±19,55	212,4±59,10	-39,8

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. a – quando difere do controle; b – quando difere do grupo EEtOH-Ec 300 mg/Kg (Monsenhor Gil), c – quando difere do grupo EEtOH-Ec 2000 mg/Kg (Monsenhor Gil).

A diferença de toxicidade observada nos extratos obtidos da *E. contortisiliquum* coletada em diferentes localidades, provavelmente decorre do fato de que os compostos químicos responsáveis pela ação tóxica oscilam de um espécime para outro, não sendo distribuídos de modo homogêneo dentro do mesmo organismo vegetal. Vários fatores interferem na presença de metabólitos secundários em plantas, tais como: a sazonalidade, época do ano e métodos de coleta, nível de estímulo externo para a síntese e a qualidade do solo (Simões et al. 2000). Portanto, a toxicidade de uma planta pode ser inerente à sua composição química, como também pode sofrer influências biogeográficas (área geográfica, clima e condições de crescimento), pela parte da planta utilizada para o preparo dos extratos, pelo solvente utilizado, bem como pela variedade da planta, entre outros (Pires-Júnior et al. 2012).

Na avaliação da toxicidade subaguda, foi utilizado apenas o EEtOH-Ec de Monsenhor Gil, pois há relatos recentes de intoxicação e morte em caprinos pela ingestão das favas de tamboril neste município. Os animais tratados por via oral com o EEtOH-Ec obtido de Monsenhor Gil, nas doses de 250 mg/kg, 500 mg/kg e 1000 mg/kg, por 45 dias consecutivos, apresentaram pelo screening hipocrático, alteração nos parâmetros comportamentais, como vocalização, coçar o focinho, piloereção, lacrimação, dispnéia e diarreia. Apesar do tratamento ter resultado em efeitos tóxicos em ratas adultas, não foram observados morte nesses animais (Mello 2001, Gonzalez e Silva 2006).

Durante esse período os animais tratados com o referido extrato apresentaram redução no ganho de peso quando comparados aos animais do grupo controle (Tabela VI). As alterações no peso corporal têm sido utilizadas como um indicador de efeitos adversos das drogas e produtos químicos em animais testados (Desmarchelier et al. 1996). A toxicidade sistêmica se manifesta pela redução do desenvolvimento ponderal, redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem (Mello 2001, González e Silva 2006). O extrato etanólico das vagens de *E. contortisiliquum*, nas doses estudadas, alterou o consumo de água e ração, indicando possíveis efeitos tóxicos, dificultando a digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes, afetando o ganho de peso dos animais (Mariz et al. 2006).

Tabela VI. Efeito da administração subaguda (45 dias) do extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* (EEtOH-Ec) obtidas de Monsenhor Gil –Piauí/Brasil, no consumo de água, ração e peso corporal de ratos

Grupo	Dose mg/Kg	Consumo de água	Consumo de ração	Peso corporal		Ganho de peso (g)
				Dia 1	Dia 45	
Controle		292,8±23,91	190,8±18,12	192,2±6,33	207,6±9,49	15,4
EEtOH-Ec	250	271,1±24,45	160,0±18,76	206,3±6,01	198,9±4,61	- 7,4
	500	271,5±25,93	148,3±18,66	199,3±3,23	190,8±2,73	- 8,5
	1000	273,4±31,59	135,3±7,64 ab	206,6±2,09	192,8±5,91	- 13,8

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. a – quando difere do grupo controle b – quando difere do grupo 250 mg/Kg.

Na avaliação bioquímica dos animais tratados por 14 dias com EEtOH-Ec de Monsenhor Gil, Parnaíba e Teresina, observou-se aumento nos valores de ALT em animais tratados com EEtOH-Ec de Teresina na dose de 2000 mg/kg e tratados com EEtOH-Ec de Parnaíba na dose de 300 e 2000 mg/kg, em relação ao controle, indicando efeito hepatotóxico. Valores menores de creatinina foram identificados em animais tratados na dose de 300 e 2000 mg/kg do EEtOH-Ec de Monsenhor Gil em relação aos demais grupos tratados e controle (Tabela VII). Essa redução nos valores de creatinina do grupo tratado com EEtOH-Ec de Monsenhor Gil está associada à redução no ganho de peso desses animais.

Tabela V. Análises bioquímicas de ratas após administração aguda (14 dias) do extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* (EEtOH-Ec) de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí/Brasil, nas diferentes doses

Grupo	Dosagem (mg/Kg)	Parâmetros			
		ALT	AST	Uréia	Creatinina
Controle		79,81±11,96	175,1±20,52	36,21±1,71	0,69±0,05
EEtOH-Ec (Monsenhor Gil)	300	39,35±3,53	183,0±27,23	32,48±1,34	0,18±0,02 a
	2000	48,16±15,97	114,1±9,48	42,62±0,22	0,24±0,03 a
EEtOH-Ec (Teresina)	300	84,68±6,98	198,4±19,37	33,54±1,66	0,48±0,12 bc
	2000	118,3±13,27b	179,1±17,56	32,99±1,58	0,63±0,01 bc
EEtOH-Ec (Parnaíba)	300	124,2±16,30bc	201,5±29,55	39,70±6,64	0,72±0,07 bc
	2000	120,3±0,22 b	127,3±0,11	33,26±0,15	0,68±0,01 bc

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. a – quando difere do controle; b – quando difere do grupo EEtOH-Ec 300 mg/Kg (Monsenhor Gil), c – quando difere do grupo EEtOH-Ec 2000 mg/Kg (Monsenhor Gil).

As alterações dos parâmetros bioquímicos do soro em seus diversos graus de ocorrência são utilizadas no diagnóstico de toxicidade induzida por drogas, em tecidos específicos (Ramaiah 2007). AST e ALT são indicadores que auxiliam na detecção de lesões celulares hepáticas (Messias et al. 2010). Quando ocorre uma lesão, tais enzimas extravasam para a corrente sanguínea, promovendo o aumento da concentração sérica das mesmas. Várias enfermidades podem causar lesão de hepatócitos e extravasamento da ALT tais como hipóxia, alterações metabólicas que resultem em acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, drogas e substâncias químicas tóxicas, toxinas bacterianas, inflamação e neoplasia hepática (Thrall 2007).

A diminuição da concentração plasmática dessas enzimas pode estar associada a três fatores: diminuição de processo lesional, quando em valores altos; diminuição de sua produção, como em caso de hepatopatias crônicas ou mecanismos inibitórios; e aumento de sua excreção (Stockham e Scott 2008). Segundo Yeh (2011), substâncias tóxicas podem provocar inflamação e degeneração gordurosa do fígado pela lesão de mitocôndrias, incapacitando-o de metabolizar adequadamente as gorduras, o que pode levar à destruição de células e inflamação.

A creatinina constitui-se em um composto orgânico nitrogenado não proteico utilizada para o diagnóstico de lesões renais (Vieira et al. 2008). Existe relação direta da massa muscular com a quantidade de creatinina corporal, uma vez que a creatinina é produto final do metabolismo proteico, fornecendo um parâmetro de massa muscular. Com redução da creatinina, supõe-se uma redução da massa muscular (Vannucchi et al. 1996). Análises de ureia e creatinina são

realizadas para a avaliação da função renal, sendo indicativos de lesão renal, quando se apresentam elevados (Lamb et al. 2008).

Na avaliação macroscópica dos órgãos removidos dos animais tratados com EEtOH-Ec de diferentes localidades, nas doses de 300 e 2000 mg/kg, foi observado congestão hepática e padrão lobular hepático evidenciado. Com relação à avaliação do peso relativo desses órgãos, apenas a dose de 2000 mg/kg do EEtOH-Ec de Parnaíba apresentou diferença significativa em relação ao controle quando analisados o peso relativo do estômago, rim direito e intestino delgado (Tabela VIII).

Tabela VIII. Peso relativo dos órgãos (%) de ratos tratados agudamente (14 dias) com extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* (EEtOH-Ec) de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba – Piauí/Brasil

Órgão	Controle	EEtOH-Ec					
		Monsenhor Gil		Teresina		Parnaíba	
		300 mg/Kg	2000 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
Fígado	2,45±0,34	3,42±0,36	3,66±0,17	2,61±0,94	3,54±0,08	3,53±0,26	5,42±1,52
Baço	0,23±0,03	0,31±0,05	0,19±0,02	0,20±0,07	0,31±0,03	0,29±0,04	0,46±0,13
Estômago	0,87±0,04	0,73±0,04	1,92±0,43	1,01±0,48	1,67±0,36	1,15±0,15	3,29±1,08abc def
Coração	0,28±0,05	0,35±0,03	0,34±0,03	0,31±0,11	0,39±0,03	0,41±0,03	0,42±0,13
Rim esquerdo	0,27±0,04	0,37±0,03	0,41±0,03	0,28±0,10	0,37±0,01	0,38±0,02	0,63±0,18 ad
Rim direito	0,28±0,03	0,38±0,04	0,41±0,03	0,29±0,11	0,39±0,01	0,40±0,01	0,61±0,24
Pulmão	0,61±0,13	0,66±0,07	1,48±0,49	0,56±0,19	0,56±0,02	0,73±0,12	0,92±0,26
Intestino delgado	2,52±0,33	2,64±0,26	3,18±0,13	2,38±0,86	3,43±0,12	3,05±0,18	5,06±1,41abd
Intestino grosso	3,19±0,85	3,36±0,29	3,24±0,20	2,64±0,95	5,08±0,39	4,03±0,37	5,57±1,59

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. a – quando difere do controle; b – quando difere do grupo EEtOH-Ec 300 mg/Kg (Monsenhor Gil), c – quando difere do grupo EEtOH-Ec 2000 mg/Kg (Monsenhor Gil); d – quando difere do grupo EEtOH-Ec 300 mg/Kg (Teresina), e – quando difere do grupo EEtOH-Ec 2000 mg/Kg (Teresina); f – quando difere do grupo EEtOH-Ec 300 mg/Kg (Parnaíba).

Na avaliação macroscópica dos órgãos dos animais tratados com o EEtOH-Ec de Monsenhor Gil, nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, observou-se congestão do fígado e rins, não sendo observado alterações macroscópicas nos demais órgãos. Os valores do peso relativo (%) dos órgãos dos animais estão apresentados na Tabela IX. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no peso relativo do intestino delgado nos animais tratados com o EEtOH-Ec em relação ao veículo. Com relação ao rim direito, apenas a dose de 1000 mg/Kg diferiu da dose de 500 mg/Kg.

Tabela VI. Peso relativo dos órgãos (%) de ratos tratados subagudamente (45 dias) com extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* (EEtOH-Ec) de Monsenhor Gil – Piauí/Brasil

Órgão	Controle	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Fígado	3,47±0,21	3,79±0,08	2,79±0,02	3,93±0,24
Baço	0,24±0,02	0,25±0,02	0,22±0,03	0,30±0,04
Estômago	1,64±0,26	1,23±0,17	1,09±0,15	1,13±0,08
Coração	0,38±0,03	0,36±0,03	0,39±0,04	0,43±0,02
Rim esquerdo	0,39±0,03	0,42±0,01	0,33±0,01	0,46±0,05
Rim direito	0,39±0,03	0,40±0,01	0,35±0,02	0,47±0,03 b
Pulmão	0,62±0,08	0,64±0,11	0,59±0,05	0,67±0,06
Intestino delgado	4,93±0,64	3,06±0,19 a	2,63±0,22 a	3,41±0,18 a
Intestino grosso	3,21±0,36	4,52±0,56	3,12±0,25	4,43±0,33

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. a – quando difere do grupo 125 mg/Kg. a – quando difere do controle; b – quando difere de 500 mg/Kg.

As alterações macroscópicas observadas nos órgãos dos animais tratados por 14 e 28 dias com EEtOH-Ec, podem estar relacionados à hepatotoxicidade. Os principais sinais clínicos em intoxicações naturais e experimentais com vagens de *E. contortisiliquum* de bovinos, ovinos, caprinos, cobaias e equinos são distúrbios digestivos, cutâneos reprodutivos e de hepatotoxicidade (Tokarnia et al. 2012; Bacha et al. 2017; Machado et al. 2019). Com relação aos sinais clínicos e macroscópicos de hepatotoxicidade, os principais achados são icterícia, hepatomegalia, padrão lobular hepático aumentado, levemente aumentado, e vesícula biliar distendida (Olinda et al. 2015; Machado et al. 2019).

A análise histopatológica dos órgãos dos animais tratados por 14 dias com EEtOH-Ec de Monsenhor Gil, Teresina e Parnaíba, nas doses de 300 e 2000 mg/kg, mostrou congestão e hemorragia no fígado e rins dos animais de todos os grupos tratados (Figura 2). Os demais órgãos coletados não apresentaram lesões significativas.

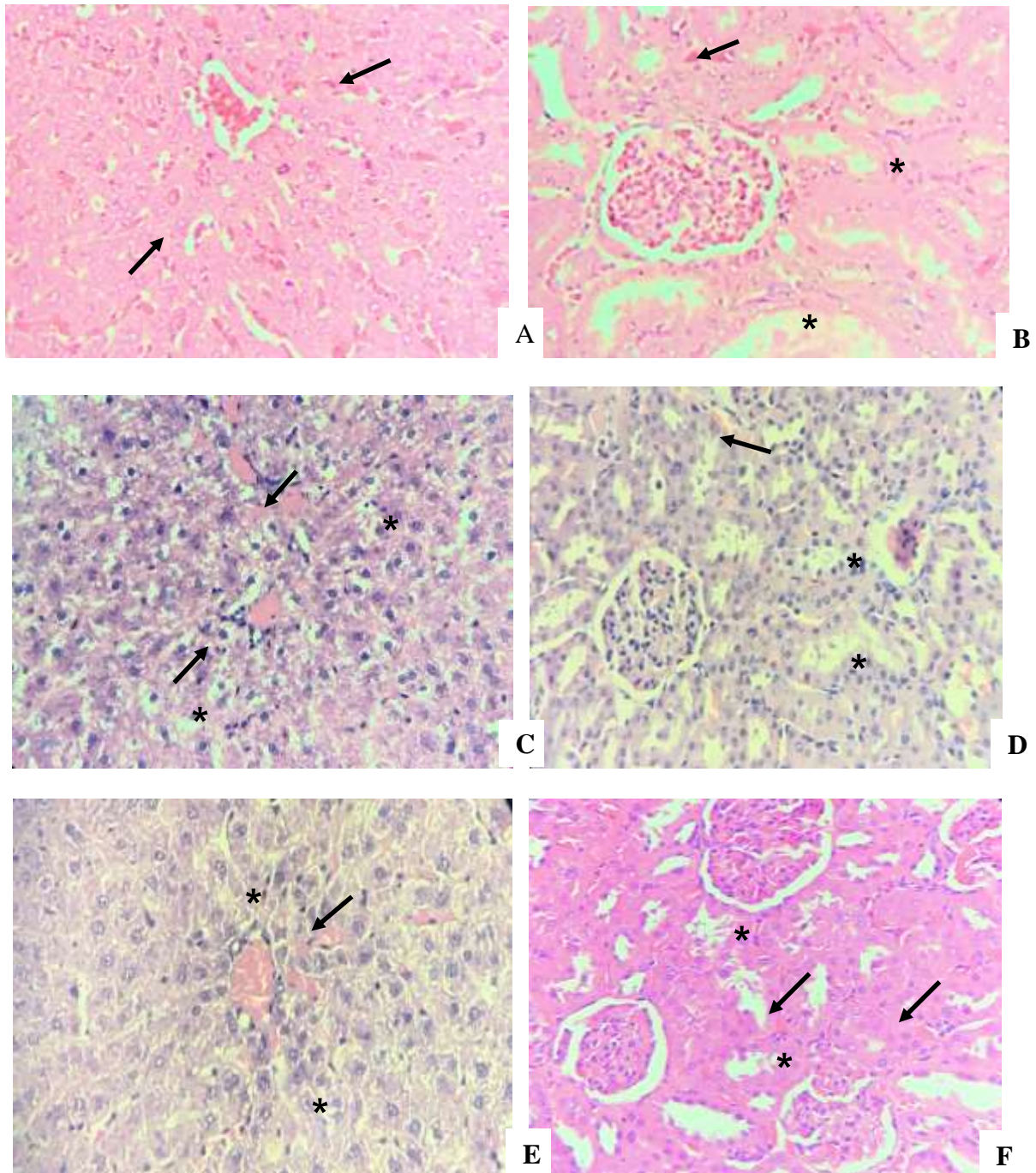


Figura II. Fotomicrografia de fígado e rim de ratos tratados agudamente (14 dias) com extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* de Monsenhor Gil (A, B), Teresina (C, D) e Parnaíba (E, F), na dose de 2000 mg/Kg. A, C e E – Fígado; B, D e F – Rim. Seta: hemorragia; *: degeneração. HE, obj. 40x.

Na análise histopatológica dos animais tratados por 45 dias com EEtOH-Ec de Monsenhor Gil nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg, observou-se vacuolização dos hepatócitos, congestão e hemorragia no fígado e hemorragia e degeneração tubular nos rins dos animais tratados (Figura 3). Os demais órgãos coletados não apresentaram lesões significativas.

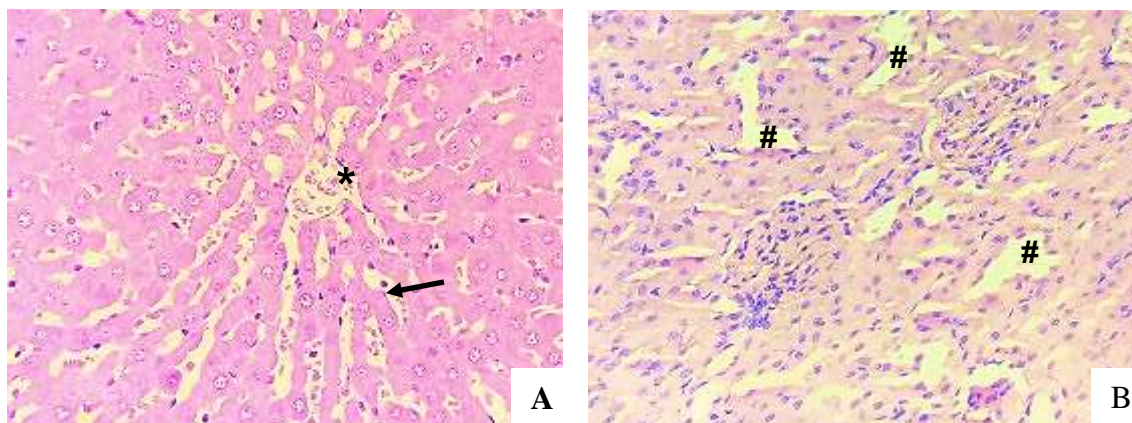


Figura III. Fotomicrografia de fígado e rim de ratos tratados subagudamente (45 dias) com extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* de Monsenhor Gil – Piauí/Brasil, na dose de 1000 mg/Kg. A – Fígado; B – Rim. Seta: hemorragia; *: congestão; # degeneração tubular. HE, obj. 40x.

O fígado é um órgão alvo importante para lesões causadas por *E. contortisiliquum*. A degeneração e necrose de hepatócitos parece ser uma característica da intoxicação por essa planta. A análise microscópica do fígado de bovinos intoxicados com *E. contortisiliquum* revelou degeneração da região centrolobular, necrose de hepatócitos, presença de hepatócitos finamente vacuolizados e aumentados de tamanho, além de perda da coesão celular, além de congestão e discreta hemorragia (Mendonça et al. 2009; Olinda et al. 2015). Em cobaios (*Cavia porcellus*), observou-se necrose hemorrágica periportal (Bonel-Raposo et al. 2008). Em aves, há necrose hepatocelular aparente e difusa com desordem da arquitetura hepática e congestão sinusal (Gadelha et al. 2015). Os cavalos com intoxicação pelas favas de *E. contortisiliquum* mostraram necrose hepática multifocal, hepatócitos com vacúolos intracitoplasmáticos, dissociação de placas de hepatócitos, proliferação de ductos biliares e infiltrado inflamatório periportal de células mononucleares (Machado et al. 2019).

Nesse estudo, a análise microscópica dos rins de ratos tratados com *E. contortisiliquum* apresentou resultados semelhantes aos observados em outras espécies, como em bovinos intoxicados com *E. contortisiliquum* observou-se necrose das células epiteliais, com cilindros granulados intratubulares obstruindo parcial e às vezes totalmente a luz dos túbulos na cortical. Havia também focos de dilatação tubular (Olinda et al. 2015). Em cobaios observou-se hemorragia e congestão dos rins, além de discreta vacuolização das células epiteliais de alguns túbulos renais (Bonel-Raposo et al. 2008).

Nesse experimento não foram observadas lesões no trato digestivo, confirmado pela ausência de alterações macro e microscópicas na análise morfométrica das vilosidades dos órgãos digestivos dos animais tratados por 14 e 28 dias com o extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum*.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que o extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* do Estado do Piauí apresenta a presença de fenóis, taninos catequicos, flavonas, flavovóis, flavanonas, flavanonóis, triterpenos e saponinas. O extrato obtido das vagens de Monsenhor Gil possui um teor maior de saponinas que os extratos das demais localidades. Os extratos dessa planta apresentam forte toxicidade no bioensaio com o microcrustáceo *A. salina* e nos ensaios de atividade hemolítica, com maior citotoxicidade observada no extrato das vagens de Monsenhor Gil. Todos os extratos apresentam toxicidade aguda e subaguda sobre ratos wistar, pois promovem alterações comportamentais, nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e morte dos animais. Essas alterações foram observadas com maior intensidade nos animais tratados com o extrato das vagens obtidas de Monsenhor Gil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APARÍCIO RM, GARCÍA-CELMA MJ, VINARDELL MP & MITJANS M. 2005. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. J Pharm Biomed Anal, 39, 1063-1067.

ATHAYDE ML. et al. 2017. Saponinas. In: SIMÕES CMO. et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed. p. 285-303.

BACHA FB, PUPIN RC, LEAL PV, CARVALHO NM, FRANCO GL, ITAVO CCBF, RIET-CORREA F & LEMOS RAA. 2017. Experimental intoxication by *Enterolobium*

contortisiliquum in sheep. Pesq Vet Bras 37:23-30.

BARBOSA-FILHO JM, ALENCAR AA, NUNES XP, TOMAZ ACA, SENA-FILHO JG, ATHAYDE-FILHO PF, SILVA MS, SOUZA MFV & DA-CUNHA EVL. 2008. Sources of alpha-, beta, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. Rev Bras Farmacogn 18: 135-154.

BEDNARCZUK VO, VERDAM MCS, MIGUEL MD & MIGUEL OG. 2010. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. Visão Acadêmica, 11(2): 43-50.

BUKOWSKA B & KOWALSKA S. 2004. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. Toxicol Lett. 152: 73-84.

CARVALHO CA, MATTA SLP, MELO FC SA, ANDRADE DCF, CARVALHO LM, NASCIMENTO PC, SILVA MB & ROSA MB. 2009. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* miers - Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. Rev Eletrônica Farm, 6(1): 51-58.

CARVALHO EB, BORGES EL, CARLOS LM, SILVA MAM, MAGALHÃES SM, GOMES FVBAF, CARVALHO MJC, QUIXADÁ ATS & PITOMBEIRA MHS. 2007. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. Rev Bras Hematol Hemoter. 29: 149-152.

CASTRO-FARIA-NETO HC, MARTINS MA, BOZZA PT, PEREZ SAC, CORREA-DA-SILVA ACV, LIMA MCR, CRUZ HN, CORDEIRO RSB, SOUSA MV & MORHY L. 1991. Pro-

inflammatory activity of enterolobin: a haemolytic protein purified from seeds of the brazilian tree *Enterolobium contortisiliquum*. *Toxicon*, 29: 1143-1150.

CHAN-BLANCO Y, VAILLAN F, PEREZ AM, REYNES M, BRILLOUET J & BRAT P. 2006. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *J Food Compos Anal* 19: 645-654.

COSTA PA, BALLUSI CA, TEIXEIRA FILHO J & GODOY HT. 2011. Fatty acids profile of pulp and nuts of brazilian fruits. *Ciênc Tecnol Aliment* 31: 950-954.

DAVANÇO MG, AGUIAR ACC, SANTOS LA, PADILHA EC, CAMPOS ML, ANDRADE CR, FONSECA LM, SANTOS JL, CHIN CM, KRETTLI AU & PECCININ RG. 2014. Evaluation of antimalarial activity and toxicity of a new pro-maquine prodrug. *PLoSone*. 9: 1-10.

DENG S, WEST BJ & JENSEN CJ. 2010. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. *Food Chem* 122: 267–270.

GAUTHIER C, LEGAULT J, GIRARD-LALANCETTE K, MSHVILDADZE V & PICHETTE A. 2009. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorg Med Chem*, 17: 2002-2008.

GOBBO-NETO L & LOPES NP. 2007. Plantas Mediciniais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova* 30: 374-381.

GONZALEZ FHD & SILVA SC. 2006. Introdução à Bioquímica Clínica Animal. Gráfica de Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 198p.

KALEGARI M, MIGUEL MD, DIAS JDFG, LORDELLO ALL, LIMA CPD, MIYAZAKI CMS, & MIGUEL OG. 2011. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch (Connaraceae). Braz J Pharmac Sci, 47: 635-642.

LAMB EJ & PRICE CP. 2008. Creatinin, urea and uric acid. In: BURTIS, CA, ASHWOOD ER E BRUNS DE. Tiez: fundamentals of clinical chemistry. 6th ed. Elsevier, p. 373 382.

LIMA NMF, SANTOS AF, PORFÍRIO Z, GOULART MO & SANT'ANA AEG. 2002. Toxicity of lapachol and their potassium solts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni cercariae*, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. Acta Trop, 83: p. 43-47.

LOPES SG. 2006. Fundamento da Toxicologia Clínica. São Paulo: Editora Atheneu. 1 ed. 157 p.

MATOS FJA. 2009. Introdução à fitoquímica experimental, 3º Edição UFC, Ceará, Barsil. 150 p.

MELO FB. 2001. Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 120p.

MENDONÇA FS, EVÊNCIO-NETO J, BARATELLA-EVÊNCIO L, DÓRIA RGS, FREITAS SH, PELEGRINI LF, CRUZ RAS., FERREIRA EV & COLODEL EM. 2009. Natural and

experimental poisoning of cattle by *Enterolobium contortisiliquum* pods (Fabaceae Mimosoideae) in Central-Western Brazil. *Acta Vet Brno* 78: 621-625.

MESSIAS JB, CARACIOLO MCM, OLIVEIRA IM, MONTARROYOS UR, BASTOS IVGA, GUERRA MO & SOUZA IA. 2010. Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratas no segundo terço da gestação submetidas à ação do extrato metanólico de *Cereus jamacaru* DC., Cactaceae. *Rev Bras Farmacogn* 20: 478-483.

MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAM JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DJ & MCLAUGHLIN JL. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 45(5): 31-34.

MIMAKI Y, HARADA H, SAKUMA C, HARAGUCHI M, YUI S, KUDO T, YAMAZAKI M & SASHIDA Y. 2003. Enterolosaponins A and B, novel triterpene disdesmosides from *Enterolobium contortisiliquum*, and evaluation for their macrophage-oriented cytotoxic activity. [Bioorg Med Chem Lett](#), 13: 623-627.

MIMAKI Y, HARADA Y, SAKUMA C, HARAGUCHI M, YUI S, KUDO T, YAMAZAKI M & SASHIDA Y. 2004. Contortisilioides A-G: isolation of seven new triterpene bisdesmosides from *Enterolobium contortisiliquum* and their cytotoxic activity. *Helv Chim Acta*, 87: 851-865.

MÜLLER NTG, FASOLO D, BERTÊ R, ELY CV & HOLZ DT. 2012. Phytochemical Analysis of the Myrtaceae leaves: *Psidium cattleianum* Sabine and *Campomanesia guazumaefolia* (Camb.) Berg. *Vivências*. [S.I.], 8: 65-71.

NGUTA JM, MBARIA JM, GAKUYA DW, GATHUMBI PK, KABASA JD & KIAMA SG. 2011. Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). Pharmacol online, 2: 458-278.

OECD. 2001. Guidelines for testing of chemical. Acute Oral Toxicity. A cute toxicity Class Method 423.

OLINDA RG, MEDEIROS RMT, DANTAS AFM, LEMOS RAA & RIET-CORREA F. 2015. Intoxicação por *Enterolobium contortisiliquum* em bovinos na região nordeste do Brasil. Pesq Vet Bras 35: 44-48.

PARRA AL, YHEBRA RS, SARDIÑAS IG & BUELA LI. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomedicine, 8, 5, 395-400.

PAULA JT, PAVIANI LC, FOGGIO MA, SOUSA IM, DUARTE GH, JORGE MP, EBERLIN MN & CABRAL FA. 2014. Extraction of anthocyanins and luteolin from *Arrabidaea chica* by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. J. Superc. Fluids, v. 86, p. 100-107.

PIRES-JÚNIOR HB, BORGES LMF, SOUSA LAD, CUNHA LC, LINO JÚNIOR RS, MELO DFA & PEREIRA ME. 2012. Avaliação da Toxicidade aguda do Extrato Hexânico de Frutos de *Melia azedarach* (Miliaceae) em camundongos. Ciênc An Bras 13: 512-519.

SAÚDE-GUIMARÃES DA & FARIA AR. 2007. Substâncias da natureza com atividade anti-Trypanosoma cruzi. Rev Bras Farmacogn. 17: 455-465.

SILVA TMS, BATISTA MM, CAMARA CA & AGRA MF. 2005. Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. Ann Trop Med Parasitol. 99: 419–425.

SIMÕES MO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA e PETROVICK PR. 2000. Farmacognosia: da planta ao Medicamento. 2. ed. Ed. Porto Alegre/Santa Catarina: Universidade UFRGS/EDFSC.

SOUZA RIC, SANTOS AC, RIBAS NLKS, COLODEL EM, LEAL PV, PUPIN RC, CARVALHO NM e LEMOS RAA. 2015. Doenças tóxicas de bovinos em Mato Grosso do Sul. Semina: Ciênc Agrár 36: 1355-1368.

THRALL MA. 2007. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1ª ed., Ed Roca, p.582.

TOKARNIA CH, JÜRGEN D e VARGAS PEIXOTO P. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil. 2ª ed. Editora Helianthus, Rio de Janeiro, 566p.

YEH MM. 2011. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, in: Saxena R. Pratical Hepaticn Pathology. A Diagnostic Approach, Elsevier, Philadelphia, p. 435-440.

CAPÍTULO 2

Toxicidade reprodutiva do extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* em ratas

Formatado de acordo com as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Toxicidade reprodutiva do extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* em ratas

Emanuelle K. F. Batista^{1*}, Ingrid dos S. Faria¹, Ricardo de Araujo¹, Silvana M. M. de S. Silva¹, Amilton Paulo Raposo Costa¹

RESUMO.- Batista, E.K.F., Faria, I.S., Araujo, R. & Silva, S.M.M.S. 2019. **Toxicidade reprodutiva do extrato etanólico de *Enterolobium contortisiliquum* em ratas.** Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Embrapa Suínos e Aves, Rodovia BR-153 Km 110, Cx. Postal 21, Distrito de Tamanduá, Concórdia, SC 89700-000, Brazil. E-mail: emanuellefrota@yahoo.com.br. A *Enterolobium contortisiliquum* é descrita como tóxica para bovinos provocando transtornos digestivos, fotossensibilização hepatógena e abortos. No entanto, estudos experimentais ainda não conseguiram reproduzir quadros de aborto em bovinos. O objetivo deste trabalho é avaliar a ação do extrato etanólico do fruto de *E. contortisiliquum* sobre o ciclo estral em ratas, sua possível ação estrogênica e/ou antiestrogênica, bem como sua toxicidade sobre o período gestacional e desenvolvimento fetal de ratos. Para avaliação do ciclo estral, foram utilizadas 24 ratas Wistar tratadas, via oral, com extrato etanólico de *E. contortisiliquum* (EEtOH-Ec) nas doses de 1000, 500 e 250 mg/Kg, e água destilada por 45 dias, e avaliadas diariamente por meio de esfregaço vaginal a fresco. No teste uterotrófico foram utilizadas 54 ratas Wistar imaturas, divididas em nove grupos e tratadas com EEtOH-Ec nas doses de 1000, 500 e 250 mg/Kg e estradiol (0,04 mg/Kg). Os tratamentos foram administrados do 21º ao 25º dia pós-natal. Para a avaliação da toxicidade gestacional e fetal foram utilizadas 24 ratas e 12 ratos, em cada teste. Após confirmação da gestação as ratas foram divididas em 6 grupos e tratadas com água destilada e EEtOH-Ec (250, 500 e 1000 mg/Kg) durante período de gestação. Na toxicidade gestacional avaliou-se o tempo de prenhez, sexo dos filhotes, número de filhotes vivos e natimortos, peso total da ninhada e desenvolvimento da prole. Na avaliação da toxicidade fetal as ratas foram anestesiadas no 21º dia de gestação e submetidas a cesariana para retirada e avaliação do útero gravídico e seu conteúdo. Realizou-se a contagem do número de fetos e sítios de implantação, pesagem do útero gravídico, dos fetos e placenta. Examinou-se os fetos quanto à presença de anomalias e/ou malformações congênitas, mediu-se a distância craniocaudal e tamanho encefálico. Depois os fetos foram fixados em formalina e processados conforme técnica de coloração óssea com alizarina, para análise esquelética. Os resultados foram submetidos a Análise de variância seguido pelo Teste de Student-Newman-Keuls. O EEtOH-Ec nas doses de 250 mg/kg, 500 mg/kg e 1000 mg/kg não apresentou alterações nas fases do ciclo estral e na duração do estro, nem apresentou efeito estrogênico e/ou antiestrogênico. O tempo de prenhez e o número de filhotes nascidos vivos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados, entretanto, na dose de 500 e 1000 mg/kg houve filhotes nascidos mortos. Na avaliação da toxicidade embriofetal, a exposição das progenitoras ao extrato etanólico durante a gestação não alterou o número de fetos e sítios de implantação, nem a massa relativa dos órgãos reprodutivos. Quanto a análise esquelética dos fetos, observou-se anomalias esqueléticas nos grupos tratados. Portanto, o EEtOH-Ec não interferiu sobre o ciclo estral e nem apresentou ação estrogênica e/ou antiestrogênica em ratas. Entretanto, causou fetotoxicidade com morte fetal, atraso no processo de ossificação, bem como alterações esqueléticas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: ciclo estral, planta toxica, *Enterolobium contortisiliquum*, toxicidade reprodutiva

ABSTRACT.- [Reproductive toxicity of the ethanolic extract of *Enterolobium contortisiliquum* in female rats.]. *Enterolobium contortisiliquum* is described as toxic to cattle causing digestive disorders, hepatogenous photosensitization and abortions. However, experimental studies have not yet been able to reproduce abortion in cattle. The objective of this work is to evaluate the action of the ethanolic extract of *E. contortisiliquum* fruit on the estrous cycle in rats, its possible estrogenic and/or antiestrogenic action, as well as its toxicity on gestational period and fetal development of rats. For evaluation of the estrous cycle phase, 24 oral Wistar rats treated with ethanolic extract of *E. contortisiliquum* (EEtOH-Ec) at doses of 1000, 500 and 250 mg/kg, and distilled water for 45 days were used. evaluated daily by fresh vaginal smear. In the uterotrophic test, 54 immature Wistar rats were used, divided into nine groups and treated with EEtOH-Ec at doses of 1000, 500 and 250 mg/kg and estradiol (0.04 mg/kg). The treatments were administered from the 21st to the 25th postnatal day. For the evaluation of gestational and fetal toxicity 24 rats and 12 rats were used in each test. After confirmation of pregnancy the rats were divided into 6 groups and treated with distilled water and EEtOH-Ec (250, 500 and 1000 mg/kg) during gestation period. In gestational toxicity we evaluated the time of pregnancy, sex of the pups, number of live and stillborn pups, total litter weight and offspring development. In the evaluation of fetal toxicity, the rats were anesthetized on the 21st day of gestation and underwent cesarean section for removal and evaluation of the pregnant uterus and its contents. We counted the number of fetuses and implantation sites, weighing of the pregnant uterus, fetuses and placenta. The fetuses were examined for congenital anomalies and/or malformations, and the craniocaudal distance and brain size were measured. Then the fetuses were fixed in formalin and processed according to the alizarin bone staining technique for skeletal analysis. The results were subjected to analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test. The EEtOH-Ec at doses of 250 mg/kg, 500 mg/kg and 1000 mg/kg showed no changes in the estrous cycle phases and estrus duration, nor did it have an estrogenic and/or antiestrogenic effect. The time of pregnancy and the number of live born pups did not show significant differences between the treated groups, however, at the dose of 500 and 1000 mg/kg there were dead born pups. In the evaluation of embryofetal toxicity, the exposure of the progenitors to the ethanolic extract during pregnancy did not alter the number of fetuses and implantation sites, nor the relative mass of the reproductive organs. Regarding skeletal analysis of fetuses, an increase in skeletal anomalies was observed in the treated groups. Therefore, EEtOH-Ec did not interfere with the estrous cycle and neither showed estrogenic and/or antiestrogenic action in rats. However, it caused fetotoxicity with fetal death, delayed ossification process, as well as skeletal changes.

INDEX TERMS: estrous cycle, toxic plant, *Enterolobium contortisiliquum*, reproductive toxicity

Introdução

Intoxicações por plantas em animais de produção são apontadas como causas importantes de prejuízos econômicos na pecuária em diversas regiões do Brasil. O número de plantas conhecidas como tóxicas para ruminantes e equinos aumentou substancialmente nas últimas décadas. São conhecidas cerca de 130 plantas de interesse pecuário no país (TOKARNIA et al. 2012, PESSOA et al. 2013, SANT'ANA et al. 2014)

A *E. contortisiliquum*, conhecida como tamboril ou orelha-de-negro, é uma árvore amplamente distribuída no Brasil e tem sido descrita como tóxica para bovinos provocando transtornos digestivos, fotossensibilização hepatógena e abortos. A intoxicação ocorre pela ingestão de favas na época da seca (LORENZI 2002, MELLO et al. 2010, BEZERRA et al. 2012, TOKARNIA et al. 2012, SANT'ANA et al. 2014, LEAL et al. 2017, PUPIN et al. 2017). Em aves, a *E. contortisiliquum* causa necrose hepatocelular difusa (GADELHA et al. 2015). Em cavalos naturalmente intoxicados, *E. contortisiliquum* causa necrose hepática multifocal e inchaço dos hepatócitos (MACHADO et al. 2019).

Casos espontâneos em caprinos foram relatados, com transtornos digestivos e aborto (BENÍCIO et al. 2007). Em ovinos há um único relato espontâneo, que provocou fotossensibilização hepatógena (BEZERRA et al. 2012). Em equinos foi observado intoxicação espontânea em três animais, com quadro de hepatotoxicidade (MACHADO et al. 2019). Os estudos experimentais ainda não conseguiram reproduzir os quadros de aborto ou fotossensibilização em bovinos, sendo observados apenas sinais digestivos (TOKARNIA et al. 1960, GRECCO et al. 2002, MENDONÇA et al. 2009, LEMOS et al. 2011) e discreta dermatite (GRECCO et al. 2002, LEMOS et al. 2011). Experimentalmente foram reproduzidos abortos em cobaias, sem sinais clínicos, mas com lesões hepáticas. Nesses animais observou-se espessamento endometrial, secreção mucosa na luz endometrial e das trompas uterinas, congestão dos vasos uterinos, regressão de corpo lúteo ovariano, alterações comuns em abortos, independente da sua etiologia (BONEL-RAPOSO et al. 2008). Não foi registrado anomalias fetais e fetotoxicidade nos casos de ingestão dessa planta.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a ação do extrato etanólico do fruto de *E. contortisiliquum* sobre o ciclo estral em ratas e investigar a possível ação estrogênica e/ou antiestrogênica por meio do teste uterotrófico, bem como avaliar seu efeito sobre o desempenho reprodutivo de ratas Wistar e sobre suas progênes, caracterizando o potencial teratogênico da planta, assim como o comportamento materno, lactação e avaliação da prole, considerando-se malformações, ganho de peso, desenvolvimento físico, motor e sensorial.

Material e Métodos

Processamento do material vegetal

Os frutos de *E. contortisiliquum* foram coletados em propriedade no município de Monsenhor Gil, Piauí-Brasil, onde já foi relatado a morte de aproximadamente 35 caprinos pela ingestão das favas de tamboril, sendo descrito também que alguns animais apresentavam falta de apetite, apatia e ao movimentarem-se o quadro se agravava, com gemidos seguidos de morte, indicando a toxicidade do tamboril nessa região. A exsicata foi depositada no Herbário TEPB da UFPI sob o número 31198.

O material vegetal foi dessecado em estufa de circulação de ar forçada durante sete dias a uma temperatura máxima de 45°C e, em seguida, triturados em moinho, obtendo-se

um pó fino. O extrato etanólico foi obtido através de maceração a frio, com etanol PA, após quatro extrações sucessivas. Posteriormente, este foi filtrado através de papel de filtro e concentrado em evaporador rotativo (Quimis 344B2) a 40°C. O material obtido foi liofilizado, acondicionado em frascos de vidro âmbar e conservado à temperatura de 4-8 °C.

Avaliação do ciclo estral

Para a realização deste protocolo, 24 ratas Wistar, provenientes do Biotério Central da UFPI, divididas em quatro grupos e tratadas com EEtOH-Ec nas doses de 1000, 500 e 250 mg/Kg e veículo (água destilada). As ratas foram avaliadas diariamente quanto à fase do ciclo estral por meio de esfregaço vaginal a fresco durante 60 dias, sendo 15 dias para avaliação do ciclo estral antes da administração do extrato e 45 dias durante essa administração. Foi realizado o lavado vaginal com solução salina a 0,9%, (introdução de 10 microlitros e imediata recuperação), depositado sobre uma lâmina de vidro e analisado por meio de microscopia de luz, nas objetivas de 10 e 40x. Os resultados individuais foram registrados e a frequência de cada fase foi determinada.

Ensaio uterotrófico

O teste uterotrófico é o ensaio padrão *in vivo* utilizado na triagem de substâncias estrogênicas e antiestrogênicas recomendado pelo Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) e foi desenvolvido conforme o Guia OECD 440 (CLODE, 2006; OECD, 2007).

Foram utilizadas 54 ratas Wistar imaturas (21±1 dia pós-natal), divididas em nove grupos e tratadas com EEtOH-Ec nas doses de 1000, 500 e 250 mg/Kg. Os tratamentos foram administrados do 21º ao 25º dia pós-natal, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Delineamento experimental do ensaio uterotrófico com extrato etanólico de *Enterolobium contortisiliquum* em ratas Wistas

Grupos	Posologia (veículo)	Vias de administração
Controle (veículo)	10 mL/kg (ad)	Vo
Extrato 250	250 mL/kg (ad)	Vo
Extrato 500	500 mL/kg (ad)	Vo
Extrato 1000	1000 mL/kg (ad)	Vo
Estradiol	0,4 mg/kg (oc)	Vo
Estradiol + tamoxifeno	0,4 mg/kg (oc) + 1 mL/kg (ad)	vo + vo
Extrato 250 + estradiol	250 mL/kg (ad) + 0,4 mg/kg (oc)	vo + vo
Extrato 500 + estradiol	500 mL/kg (ad) + 0,4 mg/kg (oc)	vo + vo
Extrato 1000 + estradiol	1000 mL/kg (ad) + 0,4 mg/kg (oc)	vo + vo

Ad= água destilada; oc= óleo de canola; vo= via oral.

Após os cinco dias de tratamento, as ratas foram eutanasiadas por associação de 80 mg de ketamina + 8 mg de xilazina, por Kg de peso corporal para coleta de ovários e útero. A massa de cada órgão foi mensurada e realizado o cálculo da massa relativa.

Desempenho reprodutivo materno e desenvolvimento fetal

Foram utilizadas 24 ratas Wistar e 12 ratos machos adultos, acasalados na proporção de um macho para duas fêmeas. O protocolo de toxicidade gestacional foi desenvolvido conforme o Guia OECD 421 (OECD 2015). Foram feitos esfregaços vaginais diários para confirmação da gestação, dada pela presença do tampão vaginal ou de espermatozóides no lavado vaginal, sendo este o primeiro dia da gestação (MULLER 2011). Posteriormente, as ratas foram divididas em grupos (N=6), alojadas em gaiolas

individualmente e tratadas por gavagem do primeiro ao 20º dia de gestação com: veículo (água destilada) e EEtOH-Ec nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg. A massa corporal de cada progenitora foi registrada nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 20 de prenhez para avaliar o ganho de massa corporal e recalcular a dosagem do extrato.

No 21º dia de gestação, as ratas prenhes de cada grupo foram anestesiadas (associação de ketamina e xilazina, intraperitoneal) e foi procedida uma punção cardíaca para obtenção de sangue para mensuração dos parâmetros bioquímicos (aspartato aminotransferase, alanino aminotransferase, uréia, creatinina). Na sequência, as ratas foram submetidas à cesariana para retirada e avaliação do útero gravídico e seu conteúdo e contagem dos corpos lúteos nos ovários. Realizou-se a pesagem do útero gravídico, dos fetos individualmente e da placenta de cada feto. Fez-se a contagem do número de fetos vivos e mortos, do número de sítios de implantação e os pontos de reabsorção fetal. Os parâmetros reprodutivos analisados foram: índice de implantação; índice de reabsorção; perdas pré-implantação; perdas pós-implantação; relação prole/mãe.

Os fetos foram examinados macroscopicamente e avaliados quanto à presença de anomalias e/ou malformações congênitas. Em todos os fetos vivos foi medida a distância craniocaudal (comprimento do corpo) e tamanho encefálico (distância interauricular) com auxílio de um paquímetro.

Posteriormente, os fetos foram fixados (por ninhada) em formalina 10% tamponada e processados conforme técnica de coloração óssea com alizarina, de acordo com Taylor e Van Dike (1985), para análise esquelética a fim de se verificar a teratogenicidade embriofetal. A avaliação individual dos fetos foi realizada em lupa com aumento de quatro vezes, tendo como parâmetro de avaliação o Atlas de Anomalias Externas e Esqueléticas de Ratos (CHAHOULD; FAQI, 1997).

Toxicidade gestacional e avaliação da progênie

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de ética em experimentação animal sob o número 320/17.

Para a avaliação da toxicidade gestacional do extrato etanólico de *E. contortisiliquum* (EEtOH-Ec) foram utilizadas 24 ratas Wistar (*Ratus norvegicus*) e 12 ratos machos adultos, provenientes do Biotério Central da UFPI. Os animais foram acasalados na proporção de um macho para duas fêmeas. Foram feitos esfregaços vaginais diários para confirmação da gestação, pela presença do tampão vaginal ou de espermatozoides no lavado vaginal, sendo este o primeiro dia da gestação (MULLER 2011). Depois, as ratas foram divididas em grupos (N=6) e tratadas com: veículo (água destilada) e EEtOH-Ec nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg, por gavagem, durante período de gestação.

Avaliou-se o tempo de prenhez (dias), sexo dos filhotes, número de filhotes vivos e natimortos. Após o nascimento, todos os filhotes de cada ninhada, foram submetidos a um exame macroscópico. Com auxílio de uma lupa se avaliou a presença de anomalias e/ou malformações externas, analisando-se olhos, boca, implantação das orelhas, conformação craniana, membros anteriores e posteriores, perfuração anal e caudal. O peso total da ninhada foi registrado nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 após o nascimento, para determinar o ganho de peso.

Após o parto, uma vez ao dia, durante o período de lactação (21 dias), foi observado o comportamento materno segundo Calliari (1998). A avaliação do comportamento materno foi realizada com base nos parâmetros: ausência ou presença de ninho; todos os filhotes no ninho; todos os filhotes no ninho com a mãe; e todos os filhotes no ninho com a mãe amamentando (presença de leite no estômago dos mesmos, sendo esta indicativa da

amamentação).

As crias foram examinadas diariamente quanto ao aparecimento de pelos, desdobramento das orelhas, erupção dos dentes incisivos, abertura dos olhos e início da puberdade (descida dos testículos ou abertura vaginal). A prole também foi avaliada quanto ao desenvolvimento sensorial no decorrer da lactação, observando-se o surgimento de reflexos como: preensão palmar, endireitamento postural e geotaxia negativa. Cada filhote foi examinado diariamente, por um período de latência de 15 segundos a 1 minuto, registrando-se o dia em que tais reflexos ocorreram pela primeira vez, em toda a ninhada em sua forma matura, sendo considerado dia da ontogênese de tais reflexos.

A avaliação da atividade geral da prole foi realizada pela observação da atividade motora, sensorial e exploratória dos animais em campo aberto (CALLIARI 1998) nos dias 10, 13, 16, 18 e 21 da lactação, por 1:30 minutos, registrando-se os seguintes parâmetros: Locomoção (LO), Levantar (LE) e Limpeza (LI).

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média±erro padrão da média e analisados estatisticamente utilizando o teste de Análise de variância (ANOVA). As diferenças foram avaliadas pelo Teste de Student-Newman-Keuls. Em todas as situações foi adotado o nível de significância $p < 0,05$. Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6.0.

Resultados e Discussão

A citologia vaginal é um método simples, rápido e eficaz, onde observa-se variações dos tipos celulares vaginais que coincidem com a fase hormonal correspondente, sofrendo modificações ao longo do ciclo estral, sob influência dos hormônios esteroides estradiol e progesterona. O epitélio vaginal responde às mudanças do estrógeno circulante e a citologia vaginal pode ser interpretada como uma mensuração indireta das concentrações de estrógeno (PIMENTEL et al. 2014). Durante o ciclo estral a maturação e ovulação do folículo pré-ovulatório ocorre sob influência de hormônios ovarianos e extraovarianos. Qualquer alteração nestes hormônios leva a irregularidade na função do ovário e mudanças na duração das fases do ciclo estral (SHIVALINGAPPA et al. 2002). Nesse estudo não foram observadas alterações nas fases do ciclo estral, bem como na duração do estro de ratas tratadas com EEtOH-Ec nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg por 45 dias (Tabela 2).

Tabela 2. Número de dias em cada fase do ciclo estral em ratas Wistar tratadas com extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum* (EEtOH-Ec) nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg durante 45 dias

Grupo	Dosagem (mg/Kg)	Fases do ciclo estral (dias)			
		Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Controle		6,00±1,12	9,00±1,46	18,33±3,25	6,83±3,00
	250	4,00±1,03	7,33±1,52	15,83±2,88	5,83±2,27
	500	6,17±1,47	7,00±1,51	17,00±3,21	4,50±1,15
	1000	6,60±1,08	6,33±1,02	16,33±2,47	10,60±2,89

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK

O teste uterotrófico é um ensaio padrão para detecção de substâncias estrogênicas através do aumento da massa uterina (OECD 2007). Também pode ser utilizado para

verificação de antiestrogenicidade de uma substância. Sendo esta administrada em combinação com estradiol e apresentando redução do peso uterino (SOUZA 2016). O 17 α -etinilestradiol é um potente estrogênio sintético lipossolúvel, rapidamente absorvido pelo organismo e é amplamente ligado a proteínas plasmáticas (GUISELLI & JARDIM 2007). É muito utilizado como contraceptivo oral e recomendado como controle positivo para estrogenicidade (OECD 2007).

No grupo tratado com estradiol, os animais apresentaram um aumento na massa relativa do útero vazio quando comparados ao veículo e ao tratamento com EEtOH-Ec. Para investigar os efeitos antiestrogênicos desse extrato, os animais foram tratados com estradiol (0,4 mg/kg, v.o.) associado ao EEtOH-Ec (250 mg/kg, 500 mg/kg e 1000 mg/kg). Foi observado um aumento da massa uterina dos grupos tratados com estradiol associados ao EEtOH-Ec semelhantes ao grupo de animais que recebeu estradiol na dose de 0,4 mg/kg, por via oral. O grupo de animais tratados com estradiol combinado ao tamoxifeno reduziu a massa uterina. Os resultados deste estudo mostraram que o EEtOH-Ec não apresentou efeito modulador da atividade estrogênica dependente da relação estrogênio/receptor. A associação de EEtOH-Ec com estradiol não promoveu potencialização nem inibição da atividade estrogênica (Tabela 3).

Tabela 3. Peso relativo do útero e ovários de ratas Wistar imaturas tratadas com extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum*

Grupo	Dosagem (mg/Kg)	Parâmetros (g)		
		Útero	Ovário direito	Ovário esquerdo
Controle		0,09±0,01	0,04±0,004	0,03±0,003
EEtOH-Ec	250	0,07±0,01	0,04±0,007	0,05±0,007
	500	0,11±0,03	0,03±0,003	0,04±0,003
	1000	0,10±0,01	0,04±0,006	0,04±0,003
Estradiol	0,4	0,29±0,04 ab	0,04±0,009	0,04±0,005
Estradiol + EEtOH-Ec	250	0,34±0,05 ab	0,04±0,003	0,05±0,002
	500	0,34±0,07 ab	0,04±0,009	0,04±0,003
	1000	0,40±0,05 ab	0,05±0,005	0,09±0,005
Estradiol + Tamoxifeno	0,4 + 1,0	0,18±0,003 cd	0,04±0,006	0,05±0,003

Resultados expressos em média \pm E.P.M. ANOVA seguida de S.N.K. a – quando difere do controle; b – quando difere do EEtOH-Ec (250, 500 e 1000 mg/Kg); c – quando difere do Estradiol; d – quando difere do Estradiol + EEtOH-Ec (250, 500 e 1000 mg/Kg).

O tamoxifeno é um modulador seletivo dos receptores estrogênicos que quando associado a baixas doses de estradiol, age como um agonista parcial; e quando combinado a altas doses de estradiol exerce ação de antagonista dos receptores estrogênicos (FONG et al. 2010). Não existe na literatura qualquer dado que demonstre a atividade estrogênica e moduladora estrogênica desse extrato, intensificando a importância dos resultados deste trabalho.

Com relação ao desempenho reprodutivo materno de ratas tratadas com EEtOH-Ec nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg e desenvolvimento fetal de sua prole, observou-se diferença relacionada à massa da placenta do grupo que recebeu a dose de 250 mg/Kg de EEtOH-Ec em relação ao controle e ao grupo tratado com a dose de 1000 mg/Kg. A maior dose analisada resultou em menor quantidade de filhotes, menor índice de implantação e menor peso do útero gravídico, o que sugere a embriofetotoxicidade do extrato nesta dose (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros reprodutivos de ratas expostas ao extrato etanólico de *Enterolobium contortisiliquum* durante o período gestacional

Variáveis	Tratamento			
	Controle	EEtOH-Ec		
		250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Fetos vivos	9,67±0,67	10,33±2,67	11,67±1,20	8,33±2,03
Número de implantação	10,33±0,88	11,00±3,00	12,00±1,00	8,67±1,86
Reabsorção	0,67±0,33	0,67±0,33	0,33±0,33	0,67±0,67
Peso placenta (g)	0,69±0,02	0,56±0,03a	0,62±0,01	0,65±0,03b
Peso do útero gravídico (g)	48,40±4,75	40,55±9,56	42,27±2,28	39,03±7,21
Peso dos ovários (g)	0,19±0,04	0,29±0,05	0,15±0,04	0,17±0,01
Corpo lúteo	11,33±0,88	12,00±3,00	12,33±0,88	10,00±2,00
Índice de implantação (%)	91,38±5,27	90,00±3,33	97,22±2,78	88,89±5,56
Índice de reabsorção (%)	6,11±3,09	4,76±2,38	3,03±3,03	6,67±6,67

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de S.N.K. a – quando difere do grupo controle; b – quando difere do grupo 250 mg/Kg.

A avaliação dos índices reprodutivos é importante para analisar a possível influência do extrato da planta sobre o organismo das progenitoras, já que a toxicidade materna pode se manifestar como uma alteração transitória ou permanente na fisiologia da mãe, podendo ser refletida na prole, através do aparecimento de efeitos adversos durante o desenvolvimento embrionários ou pós-natal, além da ocorrência de malformações (BORGES et al. 2005, MOTTA 2014). No presente trabalho foram observados sinais clínicos de toxicidade, como piloereção, hipoatividade, frêmito vocal e sangramento vaginal, em ratas expostas às diferentes doses do extrato. No entanto, não foram observados sinais de aborto nem mortalidade durante esse período experimental. O período de gestação é uma das fases mais sensíveis do ciclo reprodutivo e que resulta em repostas importantes. Durante esse período, a maioria dos agentes atravessa facilmente a placenta, podendo resultar em efeitos importantes sobre o organismo embriofetal quando há exposição materna a agentes químicos (DAMASCENO et al. 2008). A administração de substâncias tóxicas às mães durante a organogênese (7^o-15^o dia de gestação) e desenvolvimento fetal (16^o-21^o dia de gestação), pode promover morte embrionária e/ou fetal, malformações viscerais e/ou esqueléticas, sítios de ossificação incompleta e diminuição de peso corporal fetal (WISE 2016).

Nos bioensaios de avaliação de toxicidade embriofetal são considerados os fatores de mortalidade, presença de anomalias e redução no peso corpóreo (CHERNOFF et al. 2008). A Tabela 5 mostra os parâmetros fetais dos animais dos grupos controle e tratados. No presente estudo, o EEtOH-Ec na dose de 250 mg/Kg causou alteração significativa em peso, comprimentos fetais e diâmetro do crânio, em relação ao grupo controle. No entanto, o peso fetal não é considerado parâmetro conclusivo em estudos de desenvolvimento porque pode variar de acordo com o tamanho da ninhada (ALIVERTI et al. 1979).

Tabela 5. Parâmetros fetais de filhotes de ratas Wistar tratadas com extrato etanólico de *E. contortisiliquum* durante o período gestacional

Variáveis	Tratamento			
	Controle	EEtOH-Ec		
		250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Peso feto (g)	3,28±0,22	1,91±0,08 a	2,94±0,14	2,90±0,14
Comprimento do corpo (cm)	4,44±0,16	3,51±0,08 a	4,45±0,08	4,49±0,09
Diâmetro do crânio (cm)	0,88±0,01	0,68±0,01 a	0,84±0,02	0,79±0,02b

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de SNK. a – quando difere do grupo controle; b – quando difere do grupo 500 mg/Kg.

A organogênese é altamente sensível à exposição de substâncias tóxicas (OXENDINE et al. 2006) e esta interação pode desencadear efeitos adversos no desenvolvimento esquelético, que são denominados anomalias (CHAHOUUD 2005). Durante a cesariana, logo após a abertura do útero, cada feto foi separado da placenta e analisado para verificação da ocorrência de anomalias externas visíveis. Esta análise não demonstrou o aparecimento de qualquer anomalia tanto no grupo controle quanto nos tratados nas diferentes doses. Contudo, a análise esquelética dos fetos de ratas tratadas com EEtOH-Ec nas diferentes doses, apresentou anomalias esqueléticas quando comparados com o grupo controle. Os fetos das ratas tratadas com o EEtOH-Ec na dose de 250 mg/Kg apresentaram ossificação incompleta do osso occipital; os fetos das ratas tratado com EEtOH-Ec na dose de 500 mg/Kg apresentaram ossificação incompleta do osso occipital e do sacro, ausência de vértebras caudais, além de aumento de fontanela; já os fetos das ratas tratado com EEtOH-Ec na dose de 1000 mg/Kg apresentaram ossificação incompleta do osso occipital, do sacro e vertebrae caudais (Figura 1), indicando uma possível ação dessa planta sobre a formação óssea.

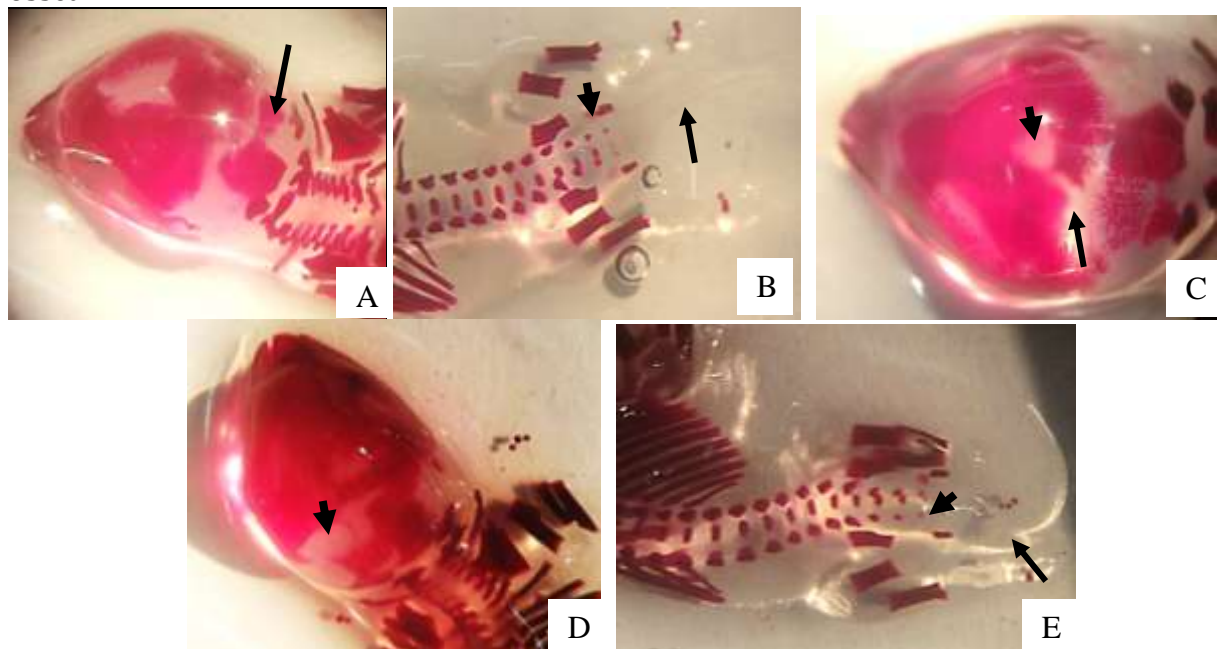


Figura 1. Alterações esqueléticas observadas em fetos de ratas Wistar tratadas com extrato etanólico de *Enterolobium contortisiliquum* nas doses de 250 mg/Kg (A), 500 mg/Kg (B, C) e 1000 mg/Kg (D, E). A - ossificação incompleta do osso occipital; B - ossificação incompleta do sacro e ausência de vértebras caudais; C - ossificação incompleta do osso occipital e aumento de fontanela; D - ossificação incompleta do osso occipital; E - ossificação incompleta do sacro e vertebrae caudais.

Os sinais de ossos incompletos são uma indicação útil de ossificação tardia no esqueleto da prole de ratos (MARQUES et al. 2010). Os retardos no desenvolvimento ósseo estão relacionados à ausência de centros de ossificação em estruturas bilaterais ou na presença de forma e/ou tamanho claramente sugestivos de um estágio precoce de desenvolvimento (LORK 1997). De acordo com Chahoud et al. (1999), é improvável que anormalidades e variações esqueléticas afetem adversamente a sobrevivência ou a saúde dos fetos. Provavelmente, isso resulta de um atraso no crescimento do desenvolvimento ou morfogênese que, de outra forma, seguiu um padrão normal de desenvolvimento.

Com relação ao teste de toxicidade gestacional e avaliação da progênie, as ratas tratadas com EEtOH-Ec, nas três doses estudadas, apresentaram alterações comportamentais tais como, sangramentos vaginal, hipotatividade, frêmito vocal e piloereção, durante o período da gestação. A avaliação da possível influência desse extrato sobre o organismo materno é fundamental, pois a toxicidade materna pode se manifestar como uma alteração transitória ou permanente na fisiologia materna, podendo também ser refletida na saúde da prole, através do aparecimento de efeitos adversos durante o desenvolvimento embrionário, com malformações e outras alterações que podem perdurar até a vida adulta (BORGES et al., 2005). Isso permite compreender a relação de algumas substâncias com o desenvolvimento físico, formação dos sistemas nervoso e endócrino, além de desordens funcionais e de comportamento na prole (ROGERS & KALVLOCK 2012).

O tempo de prenhez e o número de filhotes nascidos vivos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados, entretanto, na dose de 500 e 1000 mg/kg houve filhotes nascidos mortos, sugerindo a toxicidade do extrato sobre a gestação dessa progênie (Tabela 6). A exposição a substâncias químicas durante o desenvolvimento fetal normalmente resulta em efeitos no crescimento e na maturação funcional podendo resultar em embriofetividade (GÓRNIK et al. 2008). As alterações causadas pela *E. contortisiliquum* se devem possivelmente aos efeitos tóxicos de saponinas. Diferentes tipos de saponinas foram identificadas nessa planta, sendo associadas a distúrbios digestivos, fotossensibilidade e aborto em bovinos (SILVA et al. 2006, ASSIS et al. 2009, MELLO et al. 2010, SCHONS 2011, BEZERRA et al. 2012, TOKARNIA et al. 2012, SANT'ANA et al. 2014, SOUZA et al. 2015), diarreia e aborto em cabras (BENÍCIO et al. 2005, ASSIS et al. 2009) e hepatotoxicidade e abortos em cobaias (CARVALHO et al. 1981, BONEL-RAPOSO et al. 2008).

Tabela 6. Performance reprodutiva de ratas Wistar tratadas com extrato etanólico de *Enterolobium contortisiliquum* durante o período gestacional

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Tempo de prenhez (dias)	Fetos vivos (N)	Natimortos (N)	Sexo dos filhotes	
					Macho	Fêmea
Controle		22,33±0,33	8,67±0,33	0	3,00±1,00	5,67±0,88
	250	23,33±0,33	9,00±1,73	0	3,67±0,33	5,33±2,03
EEtOH-Ec	500	23,33±0,33	6,00±1,68	1	3,67±0,67	4,00±0,57
	1000	23,33±0,58	9,67±3,38	4	5,00±2,51	4,67±1,20

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de S.N.K.

Na avaliação do comportamento materno, não houve diferenças nos cuidados parentais das ninhadas e na lactação dos filhotes nos grupos tratados, comparados ao controle durante os 21 dias de lactação. Todos os animais do grupo experimental e controle se mantiveram vivos e com a mãe no ninho, assim permanecendo durante toda pesquisa. Esses dados indicam que a prole teve aleitamento e cuidados maternos adequados, sugerindo ainda, que durante a lactação não houve a manifestação de alterações

morfofuncionais incompatíveis com a vida nem retardo no desenvolvimento dos filhotes.

A avaliação do ganho de peso das ninhadas foi registrada a partir do 2º até o 9º dia pós-nascimento. Nesse período, as progênes não apresentaram diferenças significativas em relação ao peso e ao ganho de peso da ninhada, quando comparado os tratamentos (tabela 7). No entanto, nas ninhadas cuja rata era tratada com 1000 mg/kg de EEtOH-Ec, nota-se um menor ganho de peso em relação ao controle no período entre o 2º e 9º dias pós-natal. Os filhotes foram pesados individualmente entre o 10º e 21º DPN, havendo menor ganho de peso no período dos Grupos Tratados. A partir do 10º DPN os filhotes ficam mais ativos, além de se alimentar do leite materno buscam as migalhas de ração deixadas pela rata, facilitando o ganho de peso individual.

Tabela 7. Avaliação do ganho de peso dos filhotes de ratas Wistar tratadas com extrato etanólico de *E. contortisiliquum* durante o período gestacional

Parâmetros	Controle (g)	EEtOH-Ec (g)		
		250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Peso da ninhada (dpn)				
2º	49,20±0,75	56,13±12,87	45,07±0,89	50,47±17,19
3º	61,20±3,03	72,27±15,33	55,00±4,91	62,13±19,88
5º	81,90±5,21	79,80±16,17	75,27±8,96	77,47±22,74
7º	104,9±7,45	113,7±21,65	91,13±5,91	92,60±25,50
9º	130,6±9,97	136,2±25,47	114,5±7,03	114,9±30,65
Ganho de peso no período	81,40±9,38	80,07±12,62	69,43±6,15	64,43±9,38
Peso individual				
10º	12,99±0,56	8,13±0,70 ab	10,68±0,56 abc	14,24±0,78 cd
13º	16,30±1,02	13,08±0,20 ab	16,85±0,57	14,01±0,23 abd
15º	14,29±0,88	18,06±0,33 ab	18,16±0,72ab	16,72±0,25 ab
17º	20,16±0,98	19,26±0,19	22,46±0,33 ac	19,08±0,28 d
19º	24,16±0,91	21,47±0,23 a	24,60±0,62 c	27,13±1,77 c
21º	27,63±1,26	26,68±0,28 b	30,21±1,27 b	29,26±1,28 b
Ganho de peso no período	14,64±0,82	18,55±0,74 a	19,53±0,89 a	15,02±0,60 bcd

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de S.N.K., $p < 0,05$. a - quando difere do grupo controle; b - quando difere do grupo 250 mg/Kg; c - quando difere do grupo 500 mg/Kg; d - quando difere do grupo 1000 mg/Kg.

A observação de características de maturação dos filhotes, como a erupção dos dentes incisivos, desenvolvimento do pêlo e abertura dos olhos é usada para avaliar o efeito de um agente tóxico sobre o desenvolvimento cerebral pós-natal (ROBINSON & BRUMLEY 2005). Quanto a maturação somática, não houve alteração no tempo de crescimento piloso, desdobramento de orelhas, abertura dos olhos, erupção dos incisivos e abertura vaginal dos filhotes de ratas tratadas com EEtOH-Ec. Entretanto, o parâmetro descida dos testículos, nos grupos de 250mg/Kg e 1000mh/Kg, diferiram do grupo controle (Tabela 8). Desta forma, podemos sugerir que fitoconstituintes ou produtos de sua biotransformação no organismo foram capazes de atravessar a barreira placentária, atuar sobre as células em desenvolvimento e, conseqüentemente interferir acelerando o desenvolvimento da puberdade nesses dois grupos (ØSTENSEN et al. 2006).

Tabela 8. Avaliação do desenvolvimento físico dos filhotes de ratas tratadas com extrato etanólico de *Enterolobium contortisiliquum* durante o período gestacional

Parâmetros	Controle (dias)	EEtOH-Ec (dias)		
		250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Pelos	5,67±0,33	5,33±0,33	5,33±0,33	7,00±0,57
Desdobramento das orelhas	2,67±0,33	3,57±0,33	3,67±0,33	3,67±0,67
Abertura dos olhos	15,00±0,57	14,33±0,67	13,33±0,33	14,67±0,88
Erupção dos incisivos	12,33±0,33	10,67±0,33	11,00±0,57	11,67±0,67
Descida dos testículos	24,33±0,33	20,67±0,33 a	22,33±1,20	20,50±0,50 a
Abertura vaginal	41,33±0,33	38,00±0,57	41,00±1,00	37,67±3,84

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de S.N.K., p<0,05. a – quando difere do grupo controle.

A avaliação da atividade sensorial é realizada a partir do 2º DPN, pela observação diária dos reflexos de endireitamento postural, preensão palmar e geotaxia negativa. Em ratos, o equivalente ao terceiro trimestre gestacional humano ocorre após o nascimento, ou seja, o período pós-organogênese é extrauterino, sendo os 7-10 primeiros dias de vida pós-natal o período que representa o período de maior crescimento neuronal (WEINBERG et al., 2008). As funções sensoriais se desenvolvem na seguinte ordem para todos os vertebrados: tátil, vestibular, auditiva e visual. A função vestibular pode ser demonstrada pelo reflexo de endireitamento da postura do animal, que já no 2º dia de vida é capaz de exercer o reflexo de orientação dorso-ventral, embora se torne mais evidente com a idade, variações podem ocorrer. Os filhotes, com o passar do tempo, desenvolvem estratégias para a reorientação dorso-ventral a fim de facilitar o seu desempenho (WHISHAW; KOLB, 2005). Na avaliação do desenvolvimento sensorial-espacial dos filhotes não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com EEtOH-Ec e controle, conforme ilustra a Tabela 9.

Tabela 9. Avaliação do desenvolvimento sensorial-espacial dos filhotes de ratas Wistar tratadas com extrato etanólico de *E. contortisiliquum* durante o período gestacional

Parâmetros	Controle (dias)	EEtOH-Ec (dias)		
		250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Postura	5,33±0,33	6,00±0,57	6,33±0,88	6,67±0,33
Preensão palmar	5,00±0,57	5,67±0,33	6,00±0,57	6,33±0,33
Geotaxia negativa	13,33±0,33	12,33±0,67	11,67±0,88	13,67±2,40

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de S.N.K., p<0,05.

A análise da atividade motora da prole proveniente de ratas tratadas com as diferentes doses do EEtOH-Ec foi feita através do teste do campo aberto, um modelo de avaliação do comportamento relacionado à ansiedade, que avalia o efeito de determinadas substâncias nas reações dos animais submetidos a situações de estresse. Os filhotes foram avaliados quanto à atividade motora e deambulação espontânea entre o 10º e 21º dia pós natal, sendo observado menor atividade de locomoção dos animais nos grupos tratados com EEtOH-Ec nas doses de 250 e 500 mg/Kg; aumento na frequência com que os animais permanecem nas patas traseiras, em todos os grupos tratados; e diminuição na atividade de limpeza (Tabela 10).

Tabela 10. Avaliação da atividade neuromotora: Locomoção, Levantar e Limpeza dos filhotes de ratas Wistar tratadas com extrato etanólico de *E. contortisiliquum* durante o período gestacional

Parâmetros	Controle (n)	EEtOH-Ec (n)		
		250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg
Locomoção				
10 ^o	2,07±0,23	2,70±0,44	1,87±0,55	1,11±0,22 b
13 ^o	4,54±0,45	5,22±0,42	7,26±0,84 a	3,56±0,45 c
15 ^o	11,04±1,10	5,22±0,88 a	7,26±0,85	7,39±0,83
17 ^o	21,47±1,95	15,22±1,51 a	12,96±1,25 a	14,46±1,09 a
19 ^o	18,65±1,13	13,52±1,31	16,48±1,18	18,53±3,14
21 ^o	22,18±1,95	14,07±1,35 a	16,91±1,68 a	21,00±2,05 bc
Levantar				
10 ^o	1,56±0,31	0,52±0,18 a	1,87±0,48 b	0,28±0,14ac
13 ^o	2,27±0,33	4,59±0,43 a	2,52±0,39 b	2,37±0,32 b
15 ^o	3,85±0,57	6,78±0,52 a	5,65±0,62	5,54±0,68
17 ^o	3,23±0,59	3,93±0,41	8,00±0,93 ab	4,61±0,75 c
19 ^o	9,00±0,89	8,07±1,08	6,59±0,56 a	11,20±0,89 c
21 ^o	4,65±0,64	7,36±0,79 a	7,22±0,83 a	7,75±0,72 a
Limpeza				
10 ^o	0,0±0,0	0,0±0,0	0,04±0,04	0,0±0,0
13 ^o	0,46±0,18	0,18±0,07 a	0,14±0,04 a	0,28±0,08 abc
15 ^o	0,31±0,11	1,00±0,14 a	0,43±0,11 b	0,54±0,09 b
17 ^o	0,65±0,12	1,11±0,14 a	0,91±0,15	1,23±0,17 a
19 ^o	1,31±0,12	1,67±0,17 a	1,52±0,15	1,27±0,15 a
21 ^o	1,88±0,17	1,48±0,11 a	1,65±0,21	1,25±0,12 a

Resultados expressos em média ± E.P.M. ANOVA seguida de S.N.K., p<0,05. a - quando difere do grupo controle; b - quando difere do 250 mg/Kg; c - quando difere do grupo 500 mg/Kg.

Os parâmetros avaliados no teste do campo aberto podem estar relacionados às respostas que remetem ao nível de emocionalidade do animal em experimentação, o que pode gerar estímulos excitatórios ou inibitórios sobre o sistema nervoso (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2004; STEDILE et al., 2015). A ambulação e o comportamento de levantar são atividades que refletem, principalmente, uma boa coordenação motora, enquanto o comportamento de limpeza e esta mais associado ao estado emocional do animal (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2004; SACHETTI et al., 2009).

Conclusão

O extrato etanólico das vagens de *Enterolobium contortisiliquum*, nas doses avaliadas, não interferiu sobre o ciclo estral e não apresentou ação estrogênica, nem ação antiestrogênica em ratas Wistar, de acordo com a metodologia utilizada. No entanto, esse extrato provocou toxicidade materna sistêmica, demonstrado através de alterações comportamentais, como sangramentos vaginal, frêmito vocal, hipoatividade e piloereção; embriotoxicidade, exibindo menor índice de implantação, aumento no número de reabsorções, atraso no processo de ossificação, bem como alterações esqueléticas; e fetotoxicidade, com morte fetal, redução do peso corporal do feto ao nascer, diminuição da atividade comportamental exploratória e sensorial na prole de ratas tratadas com esse extrato.

Referências

- Bacha W.J. & Wood L. M. 1990. Colors atlas of veterinary histology. Philadelphia: Lea and Febiger, Philadelphia. 269p.
- Benício, T.M.A., Araújo J. A., Nardelli M. J., Nogueira F. R., & Riet-Correa F. 2007. Intoxication by the pods of *Enterolobium contortisiliquum* in goats, In: Panter K.E., Wierenga T.L. & Pfister J.A. (Eds), Poisonous Plants: global research and solutions. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK. p.80-85.
- Bezerra C.W.C, Medeiros R.M.T., Rivero B.R.C., Dantas A.F.M. & Amaral F.R.C. 2012. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos da microrregião do cariri cearense. Ciênc. Rural, 42:1070-1076.
- Borboleta L.R., Labarrere C.R., Ribeiro A.F.C., Paes-Leme F.O., Paes P.R.O., Ocarino N.M. & Melo M.M. 2011. Perfil bioquímico sanguíneo na intoxicação experimental com extrato de *Mascagnia rigida* (A. Juss.) Griseb. (Malpighiaceae) em coelhos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 63(5): 1113-1123.
- Borges, L.V.; Carmo, J.C.D.; Peters, V.M.; Las Casas, L.; Guerra, M.D.O.A. Toxicidade do *Hypericum perforatum* administrado a ratas prenhes. Ver. Assoc. Médica Bras., v. 51, n. 4, p. 206-208, 2005.
- Clode, A.S. 2006. Assessment of in vivo assays for endocrine disruption. Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 20:35-43.
- Desmarchelier C., Mongelli E., Coussio J. & Ciccía G. 1996. Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNA-binding activities of plants used by the Ese'ejas. J. Ethnopharmacol., 50(2): 91-96.
- Fong C.J., Burgoon L.D., Williams K.J., Jones A.D., Forgacs A.L. & Zacharewski T.R. 2010. Effects of tamoxifen and ethynylestradiol cotreatment on uterine gene expression in immatures, ovariectomized mice. J. Mol. Endocrinol. 45: 161-173.
- Gadelha I.C.N., Câmara A.C.L., Silva I.P., Batista J.S., Melo M.M. & Blanco B.S. 2015. Toxic effect of the pericarp of the *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong fruits on chicks. Intern. J. Appl. Res. Vet. Med., 13: 135-140.
- Gonzalez F.H.D. & Silva, S.C. 2006. Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária. 2nd ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 364p.
- Grecco F.B., Dantas A.F., Riet-Correa F., Leite C.G. & Raposo J.B. 2002. Cattle intoxication from *Enterolobium contortisiliquum* pods. Vet. Hum. Toxicol., 44: 160-162.
- Guiselli G. & Jardim W.F. 2007. Interferentes endócrinos no ambiente. Quím Nova. 30: 695-706.
- Leal P.V., Pupin R.C., Lima, S.C., Melo, G.K.A., Araújo, M.A., Gomes, D.C. & Lemos R.A. 2017. Ingestion of the pods of *Enterolobium contortisiliquum* causes hepatogenous photosensitization in cattle. Toxicon, 131: 6-10.

Lemos R.A.A., Guimarães E.B., Carvalho N.M., Nogueira A.P.A., Santos B.S., Souza R.I.C., Cardinal S.G. & Kassab H.O. 2011. Plant Poisonings in Mato Grosso do Sul, In: Riet-Correa F., Pfister J., Schild A.L.; Wierenga T. (Eds), Poisoning by Plants, Mycotoxins, and Related Toxins, CAB International, Wallingford, U.K. p. 68-72.

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

Mariz S.R., Cerqueira G.S., Araújo W.C., Duarte J.C., Melo A.F.M., Santos H.B., Oliveira K., Diniz M.F.F.M. & Medeiros I.A. 2006. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L em ratos. Ver. Bras. Farmacogn., 16: 372-378.

Mello G.W.S., Oliveira D.M., Carvalho C.J., Pires L.V., Costa F.A., Riet-Correa F. & Silva S.M.M.S. 2010. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Norte Piauiense. Pesq. Vet. Bras., 30(1): 1-9.

Mello, F.B., Jacobus, D., Carvalho, K., Mello, J.R.B. 2005. Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats. Toxicon, 45: 459-466.

Mendonça F.S., Evêncio-Neto J., Baratella-Evêncio L., Dória R.G.S., Freitas S.H., Pelegrini L.F., Cruz R.A.S., Ferreira E.V. & Colodel E.M. 2009. Natural and experimental poisoning of cattle by *Enterolobium contortisiliquum* pods (Fabaceae Mimosoideae) in Central-Western Brazil. Acta Vet. Brno, 78: 621-625.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. 2007. Uterotrophic bioassay in: a short-term screening test for oestrogenic properties. In OECD Guideline for testing of Chemicals 440. 1-21. OEDC, Paris.

OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development. 2008. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 407. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, Paris.

Pessoa C.R.M., Medeiros R.M.T. & Riet-Correa, F. 2013, Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 33(6):752-758.

Pimentel M.M.L., Santos, F.A., Dias, R.V.C., Macêdo L.B., Fonseca Z.A.A.S., André W.P.P. & Ribeiro W.L.C. 2014. Monitoramento do ciclo estral de fêmeas equinas por meio de citologia vaginal, ultrassonografia e dosagem hormonal. Arq. Ciênc. Vet. Zool., 17(1): 69-75.

Pupin R.C., Leal P.V., Lima S.C., Melo G.K.M., Pott A., Araújo M.A., Barros C.S.L. & Lemos R.A.A. 2017. *Enterolobium contortisiliquum* is a cause of acute ruminal acidosis in sheep. Toxicon 126: 90-95.

Quintans-Júnior L.J., Almeida R.N., Barbosa-Filho J.M., Duarte J.C., Tabosa I.M. Toxicidade aguda e alterações comportamentais induzidas pela fração de alcalóides totais das vagens

- de *Prosopis juliflora* (Sw) DC (Leguminosae) em roedores. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 23, n. 1, p. 5-10, 2004.
- Ramaiah S.K. 2007. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameter. *Food and Chem. Toxicol.*, 45: 1551- 1557.
- Rogers, J.M.; Kalvlock, R.J. Developmental toxicology. In: Klaasen, C.D. (Ed.) Cassarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2012. p. 107-132.
- Roop J.K., Dhaliwal P.K. & Guraya S.S. 2006. Extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* seeds inhibit folliculogenesis in albino rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38: 169-172.
- Sachetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, v.91, p. 621-632, 2005.
- Sant'ana F.J.F., Junior J.L.R., Neto A.P.F., Junior C.A.M., Vulcani V.A.S., Rabelo R.E. & Terra J.P. 2014. Plantas tóxicas para ruminantes do Sudoeste de Goiás. *Ciênc. Rural*, 44(5): 865-871.
- Shivalingappa H., Satyanarayan N.D., Purohit M.G., Sharanabasappa A. & Patil S.B. 2002. Effect of extract of ethanol *Rivea hipocretiformis* on the estrous cycle of the rat. *J. Ethnopharmacol.*, 82: 11-17.
- Souza E.F.J. Modulação de efeitos estrogênicos induzidos pelo artesunato. 61 f. 2016. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná. 2016.
- Stedile R., Hollenbach C.B., Mello F.B., Silva Mello F.P., Bing R.S., Rosa P.P., Mello J.R.B. Toxicidade reprodutiva da associação de itraconazol e beta-glucana em ratas e sua progênie. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 43, p. 1331, 2015.
- Stockham S.L. & Scott M.A. Introductory concepts. In: Stockham S.L. & Scott M.A. (Eds.). *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. 2.ed. Iowa: Blackwell, 2008. p.20.
- Tokarnia C.H., Canella C.F.C. & Döbereiner J. 1960. Intoxicação experimental pela fava da Timbaúba (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.) em bovinos. *Arqs Inst Biol Animal* 3: 73-81.
- Tokarnia C.H., Jürgen D. & Vargas Peixoto, P. *Plantas Tóxicas do Brasil*. 2ª ed. Editora Helianthus, Rio de Janeiro, 2012. 566p.
- Weinberg J., Sliwowska J.H., Lan N., Hellems K.G.C. Prenatal Alcohol Exposure: Foetal Programming, the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Sex Differences in Outcome. *Journal of Neuroendocrinology*, v.20, p. 470-488, 2008.
- Whishaw I.Q., Kolb B. *The behavior of the laboratory rat*. Oxford: Oxford University press., 2005.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estes estudos comprovam que a *Enterolobium contortisiliquum* é toxica, confirmando os relatos de caso. Sendo sua toxicidade comprovada através de testes *in*

vitro, onde o EEtOH-Ec apresenta atividade hemolítica. Nos testes com animais houve toxicidade sistêmica independente da origem do extrato, assim como foi capaz de causar danos aos órgãos responsáveis pelo metabolismo e excreção, comprovados através dos testes de toxicidade aguda e subaguda em ratos e posteriormente confirmados pelas lesões encontradas no histopatológico.

Além da toxicidade sistêmica, este estudo também foi capaz de interferir na reprodução de ratas, em especial durante o período gestacional, assim como interferiu no desenvolvimento da prole na fase pré e pós-gestacional demonstrado pela toxicidade embriofetal no teste de alizarina red e durante o desenvolvimento pós natal.

A avaliação da toxicidade do *E. contortisiliquum*, tanto *in vitro* quanto na intoxicação aguda e subcrônica em ratos wistar, demonstrou sinais de intoxicação até mesmo nas doses mais baixas utilizadas no experimento, apresentando alta toxicidade no bioensaio com *A. salina* e de atividade hemolítica, além de redução do ganho de peso e mortalidade dos animais.

Os resultados aqui apresentados contribuem para avaliação da toxicidade desta planta, pois foi possível demonstrar que o extrato etanólico do *E. contortisiliquum* é citotóxico nos testes *in vitro* e causa morte dos animais nos testes *in vivo*. É necessário que sejam conduzidos mais estudos toxicológicos com o extrato etanólico de *E. contortisiliquum* para determinação de seus efeitos sobre o sistema reprodutor durante a gestação e sobre o desenvolvimento embrionário da prole.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIO (ANVISA). **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília. 2003. 74 p.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 464 p.

ASEM, A. Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v.9, p. 113–114, 2008.

ASSIS, T. S.; MEDEIROS, R. M. T.; ARAÚJO, J. A. S.; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 29, n. 11, p. 919-924, 2009.

BACHA F. B. **Intoxicação experimental por *Enterolobium contortisiliquum* em ovinos: caracterização clínica, patológica e efeito da adaptação ao consumo da planta**. 38 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2012.

BACHA, F. B. et al. Experimental poisoning by *Enterolobium contortisiliquum* in sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 23-30, 2017.

BAILEY, S. A.; ZIDELL, R. H.; PERRY, R. W. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: What is this best analytical endpoint? **Toxicologic Pathology**, vol. 32, n. 4, p. 448-466, 2004.

BARROS, L. A. **Avaliação da atividade e toxicidade reprodutiva do extrato hidroalcoólico das folhas *Azadiractha indica* em ratos Wistar machos e fêmeas**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Piauí, 2011.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, SEIZE, **Fundamentos de Toxicologia**. ed. 3 p. 59 - 71, 2008.

BASTIANETTO, E. A. P.; CUNHA, A. C. P. P.; BELLO, M. Intoxicação de bezerros

búfalos por *Lantana* spp. em Minas Gerais: relato de caso. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 57-59, 2005.

BENÍCIO, T. M. A.; NARDELLI, M. J.; NOGUEIRA, F. R. B.; ARAÚJO, J. A. S.; RIET-CORREA, F. Intoxication by the pods of *Enterolobium contortisiliquum* in goats, In: PANTER, K. E.; WIERENGA, T. L.; PFISTER, J. A. (Eds), **Poisonous Plants: global research and solutions**. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK. 2007. p.80-85.

BERNARDI M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Editora Guanabara Koogan, ed. 6, 2017, 972 p.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Ed.) **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 807-816.

BEZERRA, C. W. C.; MEDEIROS, R. M. T.; RIVERO, B. R. C.; DANTAS, A. F. M.; AMARAL, F. R. C. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos da microregião do cariri cearense. **Ciência Rural**, vol. 42, p. 1070-1076, 2012.

BONEL-RAPOSO, J.; RIET-CORREA, F.; GUIM, T. N.; SCHUCH, I. D.; GRECCO, F. G.; FERNANDES, C. G. Intoxicação aguda e abortos em cobaias pelas favas de *Enterolobium contortisiliquum* (Leg. Mimosoideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 28, p. 593-596, 2008.

BORTOLINI, C. E. **Efeitos da administração de fitoterápicos contendo glycine max (L.) Merr durante o período de organogênese em ratas wistar**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009.

BRASIL. **Guia para a condução de estudos não clínicos de Toxicologia e segurança farmacológica necessários ao Desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, 2013. 48 pag.

BRIDGES, G. A. et al. Triennial Reproduction Symposium: deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. **Journal of animal science**, v. 91, n. 7, p. 3002-3013, 2013.

BYERS, S. L. et al. Mouse estrous cycle identification tool and images. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35538, 2012.

CÂMARA, A. C. L. et al. Embryotoxic effects of Poincianella (Caesalpinia) pyramidalis leaves on pregnant rats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Vol. 29, n. 2, p. 137-142, 2017.

CAMPOS, CARRER. Produtos e serviços veterinários. **Plantas tóxicas**. Disponível em:<http://www.camposecarrer.com.br/default.asp?secao=det.asp&codigo=116&tipo=3>). Acesso em: 10 de junho de 2016.

CARVALHO, E. B.; BORGES, É. L.; CARLOS, L. M. B.; SILVA, M. A. M.; MAGALHÃES, S. M. M.; GOMES, F. V. B. A. F.; CARVALHO, M. J. C.; QUIXADÁ, A. T. S.; PITOMBEIRA, M. H. S. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, vol. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.

CARVALHO, P. E. P. **Espécies florestais brasileiras** – recomendações silviculturais e uso da madeira. EMBRAPA-SPI. P 235-241. 1994. 639 pag.

CORRÊA, C. L.; ALONZO, H. G. A.; TREVISAN, R. M. S. Avaliação do risco. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed., 2003. Pag. 71-19.

COSTA, R. L. D.; MARINI, A.; TANAKA, D.; BERNDT, A.; ANDRADE, E. F. M. E. Um caso de intoxicação de bovinos por *Enterolobium contortisiliquum* (timboril) no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, vol. 58, n. 222, p. 313-316, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M.; FARIAS, P. A.; VIANA, G. S.; CUNHA, K. M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. The

cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicol**, vol. 40, p. 1231- 1234, 2002.

CUNHA, K. M. de A.; PAIVA, L. A. F.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus *in vitro*. **Phytotherapy Research**, vol. 17, p. 320–324, 2003.

DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; LOPES, J. R.; GARDNER, D. R.; PANTER, K.; MOTA, R. A. Embryonic death in goats caused by the ingestion of *Mimosa tenuiflora*. **Toxicol**, vol. 59, n. 5, p. 555-557, 2012.

DIAS, A. C. S. et al. Intoxicação experimental pelas favas de *Enterolobium* sp. em caprinos. 2011. Disponível em:

<http://leg.ufpi.br/20sic/Documentos/RESUMOS/Modalidade/Vida/dc5c768b5dc76a084531934b34601977>. pdf. Acesso em 10 fev. 2019.

DUARTE, A. L. L. **Intoxicações por *Amorimia* spp. e *Callaeum psilophyllum* em ruminantes**. 2012. 62f. (Tese de Doutorado), Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural , Universidade Federal de Campina Grande – Patos – Paraíba - Brasil, 2012.

EDSTAC - **Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee**. Final Report, EPA/743/R-98/003. 1998. 17 pag.

EFING, L. M. A. C. **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate. *Ilex paraguayensis* A. St-Hill**. 108f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos). Universidade Federal do Paraná. 2008.

FARIAS, D. C. C.; IMADA, L. F. Y.; KATAYAMA, L. Analise do efeito de toxicidade do chorume utilizando A. salina. **Revista Ciências do Ambiente On-line**, vol. 6, n. 1, p. 83-85, 2010.

FORTES, L. H. S. **Efeito da ovariectomia sobre o balanço autonômico cardíaco de ratas submetidas à desnutrição proteica.** 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado).

Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Ouro Preto. 2010.

GADELHA, I. C. N.; CÂMARA, A. C. L.; SILVA, I. P.; BATISTA, J. S.; MELO, M. M.; BLANCO, B. S. Toxic effect of the pericarp of the *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong fruits on chicks. **International Journal of Applied Research in Veterinary**, vol. 13, p. 135-140, 2015.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GONÇALVES, I. D. V. **Identificação precoce de suínos prolíficos por marcadores moleculares.** 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2005.

GRECCO, F.B.; DANTAS, F.A.M.; R IET-CORREA, F.; LEITE, C.G.D.; RAPOSO, J. Cattle intoxication from *Enterolobium contortisiliquum* pods. **Veterinary & Human Toxicology**, v.44, p.160-162, 2002.

HANSEN, W. F.; YANKOWITZ, J. Pharmacologic therapy for medical disorders during pregnancy. **Clinical Obstetrics Gynecology**, vol. 45, n. 1, p. 136-152, 2002.

HOLLENBACH, C. B. et al. Desenvolvimento pós-natal e potencial teratogênico da prole de ratos Wistar no estudo da toxicidade reprodutiva de duas preparações fitoterápicas contendo soja *Glycine max* (L.) Merr. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.4, p.845-852, 2010.

KNIGHT, A. P.; WALTER, R. G. Plants associated with congenital defects and reproductive failure, In: **A Guide to Plant Poisoning of Animals in North America**,

Ithaca, 2004. 13 pag.

LEAL, P. V. et al. Ingestion of the pods of *Enterolobium contortisiliquum* causes hepatogenous photosensitization in cattle. **Toxicon**, v. 131, p. 6-10, 2017.

LEMONICA I. P.; OGA, S.; CAMARGO M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. Editora Atheneu, v. 3, 2008. p. 59-71.

LEMOS, R. A. A.; GUIMARÃES, E. B.; CARVALHO, N. M.; NOGUEIRA, A. P. A.; SANTOS, B. S.; SOUZA, R. I. C.; CARDINAL, S. G.; KASSAB, H. O. Plant poisonings in Mato Grosso do Sul. In: RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A. L.; WIERENGA, T. (Eds), **Poisoning by Plants, Mycotoxins, and Related Toxins**, CAB International, Wallingford, U.K. 2011. p.68-72.

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

MAGANHA, J.; ROCHA, E. D. S.; BRANDÃO, M. A. F.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. D. O. Embryo development alteration in rats treated with lapachol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 6, p. 927-934, 2006.

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.4, p. 609-614, 2002.

MATOS, F. J. A.; LORENZI, H.; SANTOS, L. F. L.; MATOS, M. E. O.; SILVA, M. G. V.; SOUSA, M. P. **Plantas Tóxicas – Estudo de fitotoxicologia química de plantas brasileiras**, pp. 106-107, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, Brazil, 2011.

MEDEIROS, R. M. T.; NETO, S. A. G.; RIET-CORREA, F.; SHILD, A. L.; SOUSA, N. L. Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por *Aspidosperma pyrifolium*.

Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 24, Suplemento, p. 42-43, 2004.

MELLO, G. W. S.; OLIVEIRA, D. M.; CARVALHO, C. J. S.; PIRES, L. V.; COSTA, F. A. L.; RIET-CORREA, F.; SILVA, S. M. M. S. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Norte Piauiense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 30, p. 1-9, 2010.

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

MELO, M. M.; VASCONCELOS, A. C.; DANTAS, G. C.; SERAKIDES, R.; ALZAMORA FILHO, F. Experimental intoxication of pregnant goats with *Tetrapteryx multiglandulosa* A. Juss. (Malpighiaceae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 53, n.1, 2001.

MENDONÇA, F. S.; EVÊNCIO-NETO, J.; EVÊNCIO, L. B.; DÓRIA, R. G. S.; FREITAS, S. H.; PELEGRINI, L. F.; CRUZ, R. A. S.; FERREIRA, E. V.; COLODEL, E. M. Natural and experimental poisoning of cattle by *Enterolobium contortisiliquum* pods (Fabaceae Mimosoideae) in Central-Western Brazil. **Acta Veterinaria Brno**, vol. 78, p. 621-625, 2009.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., Mcl. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MIMAKI, Y.; HARADA, H.; SAKUMA, C.; HARAGUCHI, M.; YUI, S.; KUDO, T.; YAMAZAKI, M.; SASHIDA, Y. Contortisiliosides A-G: Isolation of seven new triterpene bisdesmosides from *Enterolobium contortisiliquum* and cytotoxic activity. **Helvetica Chimica Acta**, vol. 87, p. 851-865, 2004.

MIMAKI, Y.; HARADA, H.; SAKUMA, C.; HARAGUCHI, M.; YUI, S.; KUDO, T.; YAMAZAKI, M.; SASHIDA, Y. Enterolosaponins A and B, novel triterpene bisdesmosides from *Enterolobium contortisiliquum*, and evaluation for their

macrophage-oriented cytotoxic activity. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, vol. 13, n. 4, p. 623-627, 2003.

MOREIRA, L. M. A.; DIAS, A. L.; RIBEIRO, H. B. S.; FALCÃO, C. L.; FELÍCIO, T. D.; STRINGUETTI, C. et al. Associação entre o uso de abortifacientes e defeitos congênitos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, vol. 23, n. 8, p. 517-21, 2001.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 3^a ed. Ed. GUANABARA KOOGAN S.A. Rio de Janeiro, RJ, 2011. 172 p.

NAVA, A.; ROMAN, S.S. Efeito do Antimoniato de Meglumina durante o período fetal sobre o desenvolvimento físico da prole em camundongos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 14, n.1. p.37-42, 2010.

NEPOMUCENO, F. LAS CASAS, L.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com *Hypericum perforatum* durante o período de implantação. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 224-8, 2005.

NUGENT, P.; DUNCAN, J. N.; COLAGIOVANNI, D. B. The preparation of a preclinical dossier to support an investigational new drug (IND) application and first-in-human clinical trial. In: FAQI, A. S. **A comprehensive e guide to toxicology in preclinical drug development**. 1^a Ed., Editora Elsevir, 2013. pp. 318-333.

NUNES, H. M. M. et al. Effects of *Buchenavia tomentosa* consumption on female rats and their offspring. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 32, n. 4, p. 423-429, 2010.

OECD (Organization for economic co-operation and development). **Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP)**. , 2008.

OECD (Organization for economic co-operation and development). **Guideline for**

Testing of Chemicals: Repeat-dose 28 days oral toxicity study in rodents.

Guideline: 407. 2008.

OECD (Organization for economic co-operation and development). Guideline 440: **Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties**, 2007.

OECD (Organization for economic co-operation and development). Nº 421.

Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. 2015.

OLINDA, R. G. et al. Intoxicação por *Enterolobium contortisiliquum* em bovinos na região Nordeste do Brasil¹. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 44-48, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Quality control methods for medicinal plants methods**. 1998. p. 41 – 43.

PACHECO, A. O. Maceración fetal espontânea em uma borrega: hallazgos ultrasónicos y cambios plamáticos em proteína específica de la preñez ovina by progesterona. **Version Biomedical**, vol. 8, n. 1, p. 33-36, 1997.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 45-48, 2006.

PEREIRA, C. A. **Plantas tóxicas e intoxicações na veterinária**. Centro editorial e gráfico/ UFG. Goiania – GO, 1992.

PESSOA, C. R. M.; MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 33, n. 6, p. 752-758, 2013.

PIRES JÚNIOR, H.; BORGES, L.; SOUSA, L.; CUNHA, L.; LINO JÚNIOR, R.; MELO, D. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia*

azedarach (Meliaceae) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 512-519, 2012.

PUPIN, R. C.; LEAL, P. V.; LIMA, S. C.; MELO, G. K. A.; POTT, A.; ARAÚJO, M. A.; LEMOS, R. A. *Enterolobium contortisiliquum* is a cause of acute ruminal acidosis in sheep. **Toxicon**, v. 126, p. 90-95, 2017.

REIS, S.D.S.; OLIVEIRA, R.S.; MARCELINO, S.A.C.; MACÊDO, J.T.S.A.; RIET-CORREA, F.; PEDROSO, P.M.O. Congenital malformations and other reproductive losses in goats due to poisoning by *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.). **Toxicon**, v.118, p.91-94, 2016.

RIET-CORREA, F. Intoxicação por *Claviceps purpurea*. In: RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C.; SCHILD, A.L. (Eds.). **Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos**. Pelotas: Editorial Hemisfério Sul do Brasil, 1993. p. 227-239.

RIET-CORREA, F.; HARAGUCHI, M.; DANTAS, A. F.; BURAKOVAS, R. G.; YOKOSUKA, A.; MIMAKI, Y.; MEDEIROS, R. M. T.; MATOS, P. F. Sheep poisoning by *Panicum dichotomiflorum* in Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 29, p. 94-98, 2009.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J. Toxic plants for livestock in Brazil: economic impact, toxic species, control measures and public health implications. In: PANTER, K. E.; WIERENGA, T. L.; PFISTER, J. A. (ed.). (Org.). **Poisonous Plants: global research and solutions**. Wallingford: CAB International, 2007. p. 2-14.

RODRÍGUEZ, F. S.; PÉREZ, T. J. R. Plantas que afectan a la reproducción. **Ovis**, n. 89, p. 57-65, 2003.

ROEHSIG, M.; SANT'ANNA, S. G.; SALLES, K. R. R. D.; SANTOS, M. F.; YONAMINE, M. Abortifacientes: efeitos tóxicos e riscos. **Saúde, Ética & Justiça**, vol. 16, n. 1, p. 1-8, 2011.

SÁ, B. M. **Estudo da toxicidade não clínica do extrato hidroetanólico das cascas do caule de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.** 2014. 145 f. Dissertação (Mestrado em em Biodiversidade Tropical). Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). Macapá – AP. 2014.

SALMAN, S.; KUMBASAR, S.; OZGEN, U.; ERDOGAN, F.; SULEYMAN, H. Contraceptive effects of *Onosma armeniacum* on embryo implantation in rats. **Cell Membranes and Free Radical Research**, v. 1, n. 3, p. 90-94, 2009.

SANT'ANA, F. J. F. de; REIS JUNIOR, J. L.; FREITAS NETO, A. P.; MOREIRA JUNIOR, C. A. VULCANI, V. A. S.; RABELO, R. E.; TERRA, J. P. Plantas tóxicas para ruminantes do Sudoeste de Goiás. **Ciência Rural**, v.44, n.5, p.865-871, 2014.

SANTOS R.L.; ALESSI A.C. **Patologia veterinária.** Roca, Rio de Janeiro: Brasil. 2016. 856 pag.

SANTOS, D. B. **Estudo dos efeitos do extrato etanólico das folhas da *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire sobre parâmetros reprodutivos e histopatológicos em ratas.** 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Piauí, 2009.

SHIVALINGAPPA, H.; SATYANARAYAN, N. D.; PUROHIT, M. G.; SHARANABASAPPA, A.; PATIL, S. B. Effect of ethanol extract of *Rivea hypocrateriformis* on the estrous cycle of the rat. **Journal of ethnopharmacology**, v. 82, n. 1, p. 11-17, 2002.

SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 26, p. 223-236, 2006.

SOBESTIANSKY, J. et al. Falhas Reprodutivas. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos.** 2.ed. Cãnone, 2012.

SOUSA, M. A. N.; LIMA NÓBREGA, E.; ASSIS MELO, N. J.; SILVA FILHO, E. F. Intoxicações naturais e experimentais em *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (pereiro). **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 229-239, 2014.

SOUZA LIMA, M. C.; SOTO-BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**, v.55, p.320-324, 2010.

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR Journal**, 2002.

TIRAPELLI, C. R.; AMBROSIO, S. R.; COSTA, F. B.; COUTINHO, S. T.; OLIVEIRA, D. C.; OLIVEIRA, A. M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, vol. 492, p. 233-241, 2004.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. D.; PEIXOTO, P. V.; DÖBEREINER, J. **Plantas Tóxicas do Brasil**. 2ª ed. Editora Helianthus, Rio de Janeiro, 2012. 566p.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; SILVA, M. F. **Plantas toxicas da Amazonia: a bovinos e outros herbívoros**. INPA: IBGE, Rio de Janeiro, 1979, 95p.

TORALLES, M. B.; TRINDADE, B. M. C.; FADUL, L. C.; PEIXOTO JUNIOR, C. F.; SANTANA, M. A. C. C. D.; ALVES, C. A importância do Serviço de Informações sobre Agentes Teratogênicos, Bahia, Brasil, na prevenção de malformações congênitas: análise dos quatro primeiros anos de funcionamento. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. 105-110, 2009.

USHIROBIRA, T. M. A. **Avaliação etnofarmacológica e toxicológica pré-clínica in vivo do extrato bruto dos rizomas de Limonium brasiliense**. 2015. 113f. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Maringá, 2015.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste

DL50". **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, p.93-98, 2006.

VANONI, A. P. N. B. **Avaliação da atividade fitoestrogênica do extrato hidroalcoólico e da infusão das folhas de *Morus nigra* L.** 2006. 70f. Dissertação (Ciências veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

VILAS BOAS, O. M. G. C. **Farmacologia**. Alfenas: 2006. Disponível em:
<http://pt.scribd.com/doc/53304325/1/Historia-da-Farmacologia>.

YAKUBU, M. T.; ADESHINA, A. O.; OLADIJI, A. T.; AKANJI, M. A.; OLOYEDE, O. B.; JIMOH, G. A.; OLATINWO, A. W. O.; AFOLAYAN, A. J. Abortifacient potential of aqueous extract of *Senna alata* leaves in rats. **Journal of Reproduction and Contraception**, v. 21, n. 3, p. 163-177, 2010.