

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

BETHÂNIA DE AMORIM COSTA

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE
Parkia platycephala Benth SOBRE PARÂMETROS SISTÊMICOS E
REPRODUTIVOS EM RATAS WISTAR.**

TERESINA-PI

2011

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

C837a Costa, Bethânia de Amorim

Avaliação toxicológica do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth sobre parâmetros sistêmicos e reprodutivos em ratas Wistar [manuscrito] / Bethânia de Amorim Costa. – 2011.
61 f.: il.

Cópia de computador (printout).
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Piauí.
“Orientador Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa”

1. *Parkia platycephala* Benth. 2. Toxicidade sistêmica e reprodutiva. 3. Ciclo estral. 4. Potencial abortivo. I. Título.

CDD 581.634

BETHÂNIA DE AMORIM COSTA

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE
Parkia platycephala Benth SOBRE PARÂMETROS SISTÊMICOS E
REPRODUTIVOS EM RATAS WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia de Produtos Naturais, do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais “Prof. Paulo Humberto Moreira Nunes” da Universidade Federal do Piauí para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof^o. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa.

TERESINA-PI

2011

BETHÂNIA DE AMORIM COSTA

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA SOBRE PARÂMETROS SISTÊMICOS E
REPRODUTIVOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE**

Parkia platycephala **Benth.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia de Produtos Naturais, do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais “Prof. Paulo Humberto Moreira Nunes” da Universidade Federal do Piauí para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Data da aprovação: _____ de _____ de 2011

BANCA EXAMINADORA

**Prof^o. Dr^o. Amilton Paulo Raposo Costa
(Orientador)**

Universidade Federal do Piauí

**Prof^a. Dr^a. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva
(Membro)**

Universidade Federal do Piauí

**Prof^a. Dr^a. Silvéria Regina de Sousa Lira
(Membro)**

Universidade Federal do Piauí

“À minha querida mamãe”

Agradecimentos

À Deus, que tem se mantido vigilante com sua bondade e proteção, permitindo que eu supere os obstáculos, na vida.

Muito grata ao querido amigo e paciente orientador Prof^o Dr^o Amilton Paulo Raposo Costa por dispensar seu tempo, generosidade e sabedoria em minha orientação.

Aos meus queridos mãe (Elizabeth de Amorim Pereira Costa), pai (Francisco Expedito Costa), irmãos (Francisco Evandro de Amorim Costa e Jovelina de Amorim Costa), por constante apoio e incentivo.

Aos laços de amizade e carinho dos queridos prof^o. Arlindo Fernandes de Oliveira (*in memoriam*), prof^a. Valquíria Araújo Fernandes de Oliveira e Cynthia Araújo Fernandes Paula sempre presentes.

Aos meus queridos colaboradores, Leopoldo Marçal do Nascimento e Indira Régia Silva, indispensáveis à realização desta pesquisa.

À força, generosidade e momentos maravilhosos compartilhados em busca de conhecimento com os queridos amigos de turma do Mestrado em Farmacologia ano 2009.

À equipe do Laboratório de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Agrárias (CCA), em especial à prof^a. Dr^a. Silvéria Regina de Sousa Lira por todo carinho e conhecimentos científicos para concretização desta pesquisa.

À disponibilidade dos técnicos do Laboratório de Patologia Veterinária da UFPI, prof^a. Dr^a. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva e Eduardo Braz bem como a mestranda em farmacologia Melka Coelho Sá nas análises patológicas.

À prof. Dr^a. Maria Helena Chaves coordenadora do Laboratório de Análise Química da UFPI por sua colaboração para liofilização do extrato.

À todos os professores do Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais (NPPM) por suas contribuições em nossa busca por aprendizagem e crescimento.

Ao companheirismo da amiga Msa. Antonia Suely Guimarães Silva em especial por dispensar seus conhecimentos científicos para normatização desta dissertação.

Muito grata ao constante apoio, incentivo e torcida do amigo Ms. Mauro Furtado Cavalcanti.

Obrigada!

Resumo

Parkia platycephala Benth, família Leguminosae, popularmente conhecida como faveira, faveira-preta, visgueira e fava-de-bolota; tem suas vagens utilizadas na suplementação alimentar de ruminantes, nas áreas de cerrado. Algumas propriedades farmacológicas, como gastroprotetora e antinociceptiva, já foram demonstradas nas folhas desta espécie, assim estudos toxicológicos são necessários para respaldar sua utilização terapêutica, com segurança e eficácia. Este trabalho teve como objetivo avaliar toxicidade do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) sobre parâmetros sistêmicos e reprodutivos, em ratas Wistar. Na avaliação de toxicidade do ciclo estral quatro grupos de ratas não prenhas receberam: G1-água destilada (veículo), G2-250, G3-500 e G4-1000mg/kg/dia do extrato EtOH-Pp, durante trinta dias. As ratas foram examinadas diariamente por meio de esfregaço vaginal a fresco, quanto à frequência das fases do ciclo estral. Concomitantemente à toxicidade sistêmica foi realizada aferição dos consumos de água, ração e massa corpórea. Ao final deste período, as ratas foram anestesiadas e o sangue foi coletado por punção cardíaca para obtenção do soro e dosagem de AST, ALT, ALP, bilirrubina total, direta e indireta, uréia e creatinina. Logo após, foram eutanasiadas e removidos coração, cérebro, hipófise, adrenais, fígado, rins, baço, ovários e útero, os quais foram avaliados macroscopicamente, aferidas suas massas absolutas e calculadas respectivas massas relativas em proporção à massa do cérebro. Fragmentos dos órgãos foram fixados para análise histopatológica. No teste de toxicidade reprodutiva, quatro grupos de ratas prenhas receberam, durante dezenove dias: G1-água destilada (veículo), G2-250, G3-500 e G4-1000mg/kg/dia do extrato EtOH-Pp. Após este período, as ratas foram submetidas à cesarianas e retirados os úteros para avaliação do número e massa de fetos vivos, mortos e placentas, número de sítios de implantação e presença de malformações congênitas macroscópicas. Em seguida os ovários foram retirados e avaliados o número de corpos lúteos. O extrato Pp-EtOH induziu aumento do índice da fase diéstrica na dose 1000mg/kg, redução da ingestão de água e ração e da massa corpórea nas doses 500 e 1000mg/kg, quanto à massa dos órgãos, somente o útero teve redução significativa nas doses 250, 500 e 1000mg/kg. Nas dosagens bioquímicas, apenas aumento significativo de fosfatase alcalina nas doses 500 e 1000mg/kg. Quanto à toxicidade gestacional, o extrato, provocou aumento dos índices de reabsorção e perdas pós-implante na dose 1000mg/kg, sem aparecimento significativo de natimortos por ocasião da cesariana. Portanto, há evidências de toxicidade sistêmica e reprodutiva do extrato EtOH-Pp.

Palavras-chaves: *Parkia platycephala* Benth; toxicidade sistêmica e reprodutiva; ciclo estral; potencial abortivo.

Abstract

Parkia platycephala Benth, family Leguminosae, popularly known as field bean, field bean, black bean and visgueiro-of-acorn; has its pods used in supplementary feeding of ruminants in savannah areas. Some pharmacological properties, such as antinociceptive and gastroprotective, have been demonstrated in the leaves of this species, and studies are needed to support its therapeutic use safely and effectively. This experiment aimed to evaluate the toxicity of ethanol extract from leaves of *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) on systemic and reproductive parameters in Wistar female rats. In the evaluation of toxicity of the estrous cycle four groups of not pregnant rats received: G1-distilled water (vehicle), G2-250, G3-500 and G4-1000mg/kg/dia of the EtOH-Pp extract, for thirty days. The rats were examined daily by fresh vaginal smear, about the frequency of the estrous cycle phases. Concomitant with the systemic toxicity was carried out measurement of water and food consumption and body mass. At the end of this period, the rats were anesthetized and blood was collected by cardiac puncture to obtain serum and determination of AST, ALT, ALP, total bilirubin, direct and indirect, urea and creatinine. Soon after, they were euthanized and removed the heart, brain, pituitary, adrenal, liver, kidneys, spleen, ovaries and uterus, which were evaluated macroscopically measured their absolute masses and calculated their relative masses in proportion to the mass of the brain. Fragments of organs were fixed for histopathological analysis. In reproductive toxicity test, four groups of pregnant rats received, for nineteen days: G1-distilled water (vehicle), G2-250, G3-500 and G4-1000mg/kg/dia of the extract EtOH-Pp. After this period, the rats were subjected to caesarean and the uteri removed for evaluation of the number and weight of live and dead fetuses, placentas, number of implantation sites and the presence of macroscopical congenital malformations. Then the ovaries were removed and evaluated the number of corpora lutea. The extract EtOH-Pp induced increase in the rate of phase diestrica 1000mg/kg dose, reduction in water and food intake and body weight at doses 500 and 1000mg/kg, and the mass of organs, only the uterus had a significant reduction in doses 250, 500 and 1000mg/kg. In biochemical tests, only significant increase in alkaline phosphatase at doses 500 and 1000mg/kg. In the pregnancy toxicity test, the extract caused increased rates of resorption and post-implantation losses in the 1000mg/kg dose, no significant occurrence of stillbirth at the time of cesarean section. Therefore, there is evidence of systemic and reproductive toxicity of the extract EtOH-Pp.

Keywords: *Parkia platycephala* Benth; systemic and reproductive toxicity; estrous cycle; abortive potential.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ESQUEMA 1 - Mecanismo de regulação hormonal do eixo hipófise-hipotálamo-gônadas.....	23
QUADRO 1 - Alterações hormonais durante as fases do ciclo estral	24
QUADRO 2 - Estudos fitoquímicos de extratos obtidos de espécies pertencentes ao gênero <i>Parkia</i>	30
QUADRO 3 - Estudos farmacológicos de extratos obtidos de espécies pertencentes ao gênero <i>Parkia</i>	31
QUADRO 4 - Efeitos dos hormônios gastrintestinais na ingestão de alimentos: receptores e sítios de maior secreção.....	43
FIGURA 1 - Fases do ciclo estral. 1A, 1B, 1C - proestro; 1D - estro; 1E - metaestro e 1 F - diestro.....	25
FIGURA 2 - <i>Parkia platycephala</i> Benth (partes da planta): 2A - flores, 2B – planta completa com destaque para as folhas, 2C - frutos.....	32
FIGURA 3 - Fotomicrografia do útero após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de <i>Parkia platycephala</i> Benth (EtOH-Pp). 3A e 3B - infiltrado inflamatório polimorfonuclear de eosinófilos no grupo veículo e dose 500mg/kg (→), HE 20X	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Casos de intoxicação por plantas, no Brasil, entre os anos 1999-2009.....	15
TABELA 2	- Toxicidade no ciclo estral quanto a frequência de suas fases e intervalo interestro durante 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de <i>Parkia platycephala</i> Benth (EtOH-Pp) nas diferentes doses	41
TABELA 3	- Aferição do consumo de água, ração e massa corpórea das ratas após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de <i>Parkia platycephala</i> Benth (EtOH-Pp) nas diferentes doses	42
TABELA 4	- Análises bioquímicas de AST, ALT, ALP, BIL T, BIL D, BIL IND, UREA, CREA em soro de ratas após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de <i>Parkia platycephala</i> Benth (EtOH-Pp) nas diferentes doses.....	44
TABELA 5	- Massa dos órgãos das ratas em relação ao cérebro (g) após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de <i>Parkia platycephala</i> Benth (Pp-EtOH) nas diferentes doses.....	46
TABELA 6	- Toxicidade reprodutiva no estágio de implantação quanto ao número de corpos lúteos, implantações, reabsorções e índices de implantações, reabsorções, perdas pré-implante e pós-implante em ratas após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de <i>Parkia platycephala</i> Benth (EtOH-Pp) nas diferentes doses	48
TABELA 7	- Toxicidade reprodutiva no estágio de organogênese quanto ao número de placenta, fetos, fetos vivos, mortos e malformados, massa da placenta, fetos e ninhada (g) em ratas após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de <i>Parkia platycephala</i> Benth (EtOH-Pp) nas diferentes doses	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C - Antes de Cristo

ALP - Fosfatase alcalina

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA - Análise de variância

Biotex - Biotério de Experimentação do Departamento de Morfofisiologia Veterinária do Centro de Ciências Agrárias

BIL D - Bilirrubina direta

BIL IND - Bilirrubina indireta

BIL T - Bilirrubina total

cAST - Aspartato aminotransferase citosólica

CCA – Centro de Ciências Agrárias

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

CREA - Creatinina

CCK - Colecistocinina

d.C - Depois de Cristo

DL50 - Dose letal 50

EAG - Equivalente de ácido gálico

EPA - Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental)

e.p.m - Erro padrão da média

EtOH-Pp - Extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth

FDA - Food and Drugs Administration (Departamento de Drogas e Alimentos)

FSH - Hormônio folículo estimulante

GCGR – Receptor de glucagon

GD - dia da gestação

GLP - 1 - peptídeo 1 ligante de glucagon

GnRH - Hormônio liberador dos hormônios gonadotróficos

(I/R) - Isquemia e reperfusão

LH - Hormônio luteinizante

LOAEL - “Lowest observed adverse effect level” (concentração mais baixa que causa efeito adverso)

mAST - Aspartato aminotransferase mitocondrial

NOAEL - “No observed adverse effect level” (concentração que não causa efeito adverso)

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

OMS - Organização Mundial de Saúde

OXM - Oxintomodulina

PP - Polipeptídeo pancreático

PPRI - Perda pré-implante

PPSI - Perda pós-implante

PR - Parâmetro

PYY - Peptídeo PP

RDC - Resolução

RE - Resolução

RENISUS - Relação Nacional das Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

rpm - Rotações por minuto

SINITOX - Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica

VRef - Valores de referência

vs. - Versus

UFPI - Universidade Federal do Piauí

UREA – Uréia

LISTA DE SÍMBOLOS

XVI - Dezesesseis

XIX - Dezenove

XX - Vinte

% - Percentagem

U/L – Unidade por litro

mg/dL - Miligrama por decilitro

(+) - feedback positivo

(-) - feedback negativo

(↓) = Baixo

(↓↓) - Mais baixo

(↑) - Elevado

(↑↑) - Mais elevado

h - Horas

O₂ - Gás oxigênio

CO₂ - Gás carbônico

mg/kg – Miligrama por quilograma

NaCl - Cloreto de sódio

cm – Centímetro

g/kg – Gramas por quilograma

NO - Óxido nítrico

°C - Graus centígrado

n - Número

mL – Mililitro

μL – Microlitro

μM – Micrômetro

± - Mais ou menos

< - Menor que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo Geral.....	34
2.2	Objetivos específicos.....	34
3	METODOLOGIA	35
3.1	Coleta e identificação do material vegetal	35
3.2	Preparo do extrato.....	35
3.3	Animais.....	35
3.4	Protocolo experimental.....	36
3.4.1	Desenho experimental farmacológico	36
3.4.2	Toxicidade no ciclo estral	36
3.4.3	Toxicidade sistêmica	37
3.4.3.1	Consumo de água e ração	37
3.4.3.2	Massa corpórea.....	37
3.4.3.3	Parâmetros bioquímicos.....	37
3.4.3.4	Aspectos macroscópicos e massas dos órgãos.....	38
3.4.3.5	Análise histopatológica.....	38
3.4.3.6	Toxicidade reprodutiva nos estágios de implantação e organogênese	38
3.5	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	Toxicidade no ciclo estral	40
4.2	Toxicidade sistêmica	42
4.3	Toxicidade reprodutiva no estágio de implantação.....	47
4.4	Toxicidade reprodutiva no estágio de organogênese	49
5	CONCLUSÕES	51
6	PERSPECTIVAS.....	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a observação e utilização das propriedades terapêuticas das plantas medicinais por povos da antiguidade foi determinante para sua propagação como cultura popular. Relatos registram o uso de plantas por volta de 3.000 a.C. na obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung que utilizava óleo de chaulmoogra no tratamento da lepra. No ano 78 a.C., o botânico grego Pedânios Dioscórides descreveu cerca de 600 plantas medicinais, no tratado *De Materia Medica* que permaneceu por catorze séculos como fonte de referências. Em 1.550 d.C., *Ebers papyrus* descrevia plantas utilizadas no Egito (AMEH et al., 2010).

A investigação das bases terapêuticas de algumas dessas plantas, no entanto, se fez necessário, no século XVI, quando Paracelsus através do provérbio latim *similia similibus curantur*, “semelhante cura semelhante” propunha alguns indícios de seu uso clínico postulando que a forma, a cor, o sabor e odor das plantas estavam relacionadas com suas propriedades terapêuticas (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Em decorrência de sua importância para utilização terapêutica, a partir do século XIX, algumas plantas não só foram incluídas em farmacopéias alopáticas e homeopáticas como passaram a ser alvo de processo de extração de princípios ativos em substituição aos extratos vegetais, como ocorreu com o isolamento da morfina a partir da *Papaver somniferum* L., em 1803, por Setürner e até hoje utilizada no combate a dor; da quinina e quinidinas isoladas da *Chinchona spp.*, em 1819 e da atropina da *Atropa belladonna*, em 1831 (FOGLIO et al., 2006; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Os metabólitos secundários, fonte de princípios ativos dos medicamentos de origem vegetal, resultam do metabolismo das plantas e apresentam especificidade em gêneros e espécies. Suas variações ocorrem em resposta às condições de mudanças como presença de agentes herbívoros, polinizadores e microorganismos, fato que determina o caminho de biossíntese dessas substâncias caracterizando-as com ações terapêuticas ou tóxicas (PANDEY et al., 2011). Desse modo, os compostos fenólicos como flavonoides, classe de metabólitos secundários, podem apresentar tanto propriedades terapêuticas, antioxidantes e antiinflamatória quanto tóxicas, abortivas e antinutrientes, encontradas também em saponinas

(POURMORAD et al., 2006; YAKUBU et al., 2010; NWAOGU; UDEBUANI, 2010; SANDHAR, 2011).

Uma grande lacuna na produção de fármacos de origem vegetal ocorreu até meados do século XX, em decorrência da produção dos fármacos via síntese química, crescimento do poder econômico das grandes indústrias farmacêuticas e ausência das comprovações científicas das substâncias de origem vegetal. Além disso, havia dificuldade de controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais até então utilizados (RATES, 2001).

Em auxílio à saúde, o interesse por plantas medicinais ressurgiu nos últimos anos e tem sido estimulado devido ao elevado custo das drogas industrializadas, bem como à necessidade de bioprospecção de novas drogas derivadas de plantas. Dentre essas, os quimioterápicos e medicamentos fitoterápicos da medicina tradicional passaram a ter um enfoque voltado para produção industrial (SOETAN et al., 2009; PANDEY et al., 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de 4 bilhões de pessoas no mundo ou 80% da população mundial utilizam plantas medicinais na atenção primária à saúde. Com isso, vem ocorrendo um crescimento do mercado mundial de fitoterápicos, que já alcançou 60 bilhões de dólares e um crescimento anual de 5 a 15%, haja vista o fato de mais da metade dos fármacos atuais provirem de plantas (QUIRISHI et al., 2010).

De forma geral, os fatores de expansão da fitoterapia devem-se aos efeitos adversos de fármacos sintéticos, a preferência dos consumidores por produtos “naturais”, crescente validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de qualidade, desenvolvimento de novas formas de preparação e administração de produtos e ao relativo baixo custo (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

No entanto, o uso das plantas medicinais e derivados tem percorrido uma longa trajetória histórica entre a restauração da saúde e surgimento de efeito colaterais e/ou adversos, na linha tênue entre o bem e o mal, fato corroborado pelo aumento do uso “terapêutico” das plantas pela população seguindo a idéia errônea de que “se é natural, não faz mal”. Pensamento incoerente com os registros de intoxicações humanas por plantas, inclusive por aquelas usadas como medicinais (MARIZ, 2007).

Segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), no Brasil foram registrados 8.326 casos por intoxicações de plantas entre os anos de 1985 a 1993. Dados mais recentes (Tabela 1) demonstram que o problema persiste com a ocorrência de 18.579 casos, entre os anos de 1999-2009 (BORTOLETTO et al., 1996; SINITOX, 2011).

TABELA 1 - Casos de intoxicações por plantas, no Brasil, entre os anos 1999-2009

Intoxicação por plantas no Brasil										
ano	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2007	2008	2009
nºcasos	1759	1606	1672	1756	1990	1704	1959	1657	1309	1289

Fonte: (SINITOX, 2011).

O uso irracional de plantas medicinais e derivados se apresenta como grave problema de saúde pública em nosso país por diversos fatores, tais como: automedicação inadequada; uso de produtos fora do padrão mínimo de qualidade; e desinformação sobre os riscos associados aos medicamentos, que concorrem para as intoxicações registradas (MARIZ, 2007).

Evidências sugerem que os efeitos adversos do uso de plantas medicinais são menos freqüentes que os advindos de drogas convencionais, mas estudos científicos confirmam que eles existem (HAQ, 2004; GEORGE 2011).

Os efeitos adversos das plantas medicinais podem ser devido a fatores intrínsecos como toxicidade, alta dosagem e interação com drogas convencionais, e os mais conhecidos que são extrínsecos a preparação relacionam-se a vários problemas industriais como falta de padronização, falhas nas boas práticas de produção, contaminação, substituição ou adulteração de plantas, preparação incorreta ou dosagem (CALIXTO et al., 2000).

Atualmente já são conhecidos outros fatores, além da dose, que podem transformar um remédio em veneno. Relacionam-se às condições de exposição, que podem estar ligados tanto ao produto utilizado (freqüência de uso e/ou exposição, forma farmacêutica etc), quanto ao organismo do usuário (idade, sexo, raça, estados fisiopatológicos etc) e até mesmo ao uso desnecessário, como recreacional de psicofármacos (LARINI, 1993; AMARAL; BARCIA; 2003).

É reconhecido que dados de segurança e eficácia de várias plantas medicinais ainda não são suficientes para dar suporte ao seu uso, por vezes devido a falta de metodologias adequadas de avaliação destas plantas. Muitas vezes não se conhece o princípio ativo ou tóxico e sua concentração (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

Desta forma, estudos toxicológicos foram elaborados como métodos científicos para identificar e avaliar o potencial risco para a saúde humana, do uso de xenobióticos, mais especificamente no desenvolvimento de drogas candidatas a fármacos (BUCKLEY; DORATO, 2009). Quando realizados com medicamentos fitoterápicos esses estudos tem contribuído para promover o uso racional desses produtos (LAPA et al., 2000).

O conhecimento do que são medicamentos fitoterápicos é imprescindível para o desenvolvimento de estudos nos mais diversos aspectos como eficácia, segurança, controle de qualidade, regulamentação e, até mesmo, aspectos econômicos (CALIXTO, 2000).

Assim, medicamentos fitoterápicos ou fitomedicamentos são preparações padronizadas contendo uma mistura complexa de partes de uma ou mais plantas no estado natural ou processado, são obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Geralmente, os princípios ativos são desconhecidos e o produto é destituído de uma ação farmacológica forte e imediata sendo desaconselhado o seu uso em emergência. De tal forma, caracterizam-se por possuírem eficácia e risco de uso conhecidos, bem como, qualidade reprodutível e constante. Seus aspectos de eficácia e segurança podem ser validados através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações, ou ainda, em ensaios clínicos de fase três (BRASIL, 2004a).

Com a finalidade de respaldar os estudos toxicológicos para garantir segurança e eficácia durante a utilização de fitomedicamentos a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não somente publicou uma regulamentação específica para estudos de toxicidade e eficácia de medicamentos fitoterápicos, em 1996, como também um guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica e clínica de fitoterápicos, em 2004 (BRASIL, 1996, 2004 b).

O interesse das autoridades políticas brasileiras se faz presente nos últimos anos com a implementação, em 2006, da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, e a aprovação do Programa Nacional de Plantas

Medicinais e Fitoterápicos e criação do Comitê Nacional de Plantas Medicinais, em 2008, objetivando *"garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional das plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional"* (BRASIL, 2006, 2008). Para demonstrar a continuidade do enfoque a essa área de plantas medicinais, em 2009, foi publicada a Relação Nacional das Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde - RENISUS (BRASIL, 2009), o que respalda o interesse em estudos com plantas.

1.1 Toxicidade Sistêmica

As mudanças no consumo diário de ração, água e na massa corpórea são indicadores valiosos na avaliação da toxicidade de compostos ou preparações (BAILEY et al., 2004).

Em adição ao seu papel na bioquímica de muitos processos metabólicos essenciais nos mamíferos a água é requerida para ajustar a temperatura corpórea, excretar produtos finais da digestão e xenobióticos, atingir saciedade, lubrificação da alimentação na boca e estômago. Diversos fatores influenciam o consumo de água entre eles: temperatura do ambiente, nível de atividade física, ritmo diurno, conteúdo de proteínas, minerais e umidade, limpeza ou adulteração da água com substâncias tóxicas bem como alterações no paladar devido a presença de substâncias químicas que provocam redução no consumo de água nos grupos em teste (CAMPBELL et al., 2009).

Logo após à diminuição da ingestão de água uma condição de desidratação se desenvolve seguida por hiperosmolemia, falta de apetite e conseqüente diminuição da ingestão de alimento. De modo que, a influência da desidratação ocasionando falta de apetite pode ter sua explicação devido a hiperosmolemia provocar: aumento da saciedade e interferir não com o início da alimentação, mas com o seu término de forma brusca, atuando em regiões do controle hipotalâmico (WATTS; BOYLE, 2010).

Entre os vários efeitos da desidratação destacam-se: perda de massa corpórea devido a diminuição da ingestão de água e decomposição de tecidos no esforço para fornecer suficiente água para processos fisiológicos básicos (CAMPBELL et al., 2009).

Um outro importante requisito em experimentos toxicológicos é a capacidade de avaliar efeitos de xenobióticos em órgãos específicos realizada através de seus exames macroscópicos, medidas de pesos e histopatologia dos tecidos (BAILEY et al., 2004). Desta forma, alterações nas massas dos órgãos tem sido aceitas como indicadores de efeitos relacionados ao tratamento, até mesmo na ausência de mudanças morfológicas, fato que contribui para identificação de órgãos específicos quanto aos efeitos tóxicos de uma substância (WOLFSEGGER et al., 2009).

A massa corpórea é um item importante para avaliação da toxicidade de uma substância, comparando-se a massa dos órgãos em proporção da massa corpórea (massa relativa) entre grupo controle e os tratamentos verifica-se se a substância em teste alterou a massa dos órgãos (WOLFSEGGER et al., 2009).

As massas dos órgãos são usualmente calculadas como valores relativos expressos em percentagem da massa corpórea ou cérebro, um substituto da massa corpórea que usualmente não é afetado por xenobióticos (BAILEY et al., 2004; WOLFSEGGER et al., 2009).

Entre os artefatos que podem interferir nas medidas das massas corporais e influenciar as mudanças ocorridas durante as medidas das massas relativas de órgãos específicos em relação à massa corpórea estão alterações no crescimento resultante de indigestibilidade, deficiência de nutrientes ou restrição de alimentos (BAILEY et al., 2004).

As alterações dos parâmetros bioquímicos do soro em seus diversos graus de ocorrência correlacionadas com história e sinais clínicos, histopatologia e técnicas moleculares são utilizadas no diagnóstico de toxicidade induzida por drogas, em tecidos específicos (RAMAIAH, 2007).

A Injúria hepática é a mais comum manifestação de toxicidade por droga com relatos de casos por falência aguda superior a 50 % (LEE et al., 2003), e corresponde ainda ao mais largo obstáculo para o desenvolvimento de drogas e a maior razão para retirada de drogas do mercado (CULLEN; MILLER, 2006).

As mudanças significativas nas enzimas clássicas ALP (fostatase alcalina), AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) sugerem dano hepático, pois representam índices confiáveis de toxicidade hepática ou alteração da integridade da membrana celular bem como lise ou morte celular (AMIDA et al., 2007).

A magnitude e duração do aumento das atividades de enzimas de ligação hepatocelular no plasma é dependente do seu estado inato de atividade tecidual, localização, razão de remoção do plasma e o tipo e severidade da injúria (RAMAIAH, 2007).

As elevações das enzimas de ligação hepatocelular que são excretadas para a corrente sanguínea ocorrem devido alterações na permeabilidade da membrana basal-lateral dos hepatócitos que revestem os sinusóides seguinte à injúria ou distúrbios metabólicos (SOLTER et al., 2005).

Entre as principais enzimas de ligação hepatocelular estão ALT e AST. ALT é mais específica nos hepatócitos de ratos, macacos e cães; apresenta meia vida entre 40-60 horas, localização citosólica e por levar dias para retomar a níveis normais de atividade é marcador confiável para injúria hepatocelular aguda, sub-aguda e crônica (AMACHER, 2002; MEYER; HARVEY, 2004).

Enquanto AST é encontrada em variedades de tecidos como coração, cérebro, fígado, músculos esqueléticos e células vermelhas, apresenta meia-vida de 12 horas com elevações de suas concentrações seguintes a traumas musculares e hemólises. Devido localização citosólica (cAST) e mitocondrial (mAST) é necessário severa necrose no fígado para sua elevação (RAMAIAH, 2007).

As enzimas de síntese ou de indução colestática tem sua produção aumentada do lado apical da membrana plasmática que reveste o canalículo após prejuízo do fluxo biliar, colestase, tratamento exógeno de drogas como os glicocorticóides, ou excesso de corticosteróides endógeno (RAMAIAH, 2007).

Como representante das enzimas de indução colestática está a fosfatase alcalina (ALP) que é freqüentemente empregada para avaliar integridade da membrana plasmática e retículo endoplasmático (ADEBAYO et al., 2003).

De acordo com Ramaiah (2007) a fosfatase alcalina apresenta duas isoformas principais: intestinal e hepatobiliar localizadas em suas respectivas membranas, e somente a isoforma hepatobiliar é indicativa de colestase.

Um significativo aumento nos níveis da fosfatase alcalina (ALP) pode ser atribuído as alterações no metabolismo do músculo esquelético ou defeito no ducto biliar (AMIDA et al., 2007) e hepatite ou alteração óssea (OLUDURO; ADERIYE, 2009).

Entre as causas da redução de atividade da fosfatase alcalina estão a perda de componentes da membrana celular para dentro do fluido extracelular e

inibição ou inativação da molécula enzimática no local. Como consequência existe menor disponibilidade do grupo fosfato devido a fosforilação dos grupos etanolamina e colina necessários para síntese dos fosfolípidos da membrana, fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, respectivamente, afetando a flexibilidade da membrana e provocando diminuição da permeabilidade das células epiteliais (ADEBAYO et al., 2003).

Em conjunto com as enzimas de indução bilirrubina total (BIL T) pode ser empregada para detectar colestase, e corresponde a um pigmento vermelho gerado da degradação do grupo heme após ação dos macrófagos em células vermelhas sanguíneas. A bilirrubina não conjugada ou indireta (BIL IND) gerada circula ligada a albumina até o fígado onde é conjugada com ácido glicurônico, em bilirrubina direta (BIL D), através de uridina difosfato glicuronilfosfato, para poder ser excretada através dos canalículos devido aos limites impostos pela membrana canalicular sendo em seguida secretada no duodeno (RAMAIAH, 2007).

Os valores proporcionais de bilirrubina direta e indireta compreendem concentrações de bilirrubina total que é usada para diferenciar hiperbilirrubinemia hepática e extra-hepática (MEYER ; HARVEY, 2004).

Segundo Zucker et al., (2001) existem situações em que drogas aumentam significativamente os níveis de bilirrubina sem evidências histopatológicas de colestase ou clínicas de hemólise. Nestes casos é importante medir as frações de bilirrubina, pois existem drogas que podem inibir o transporte da bilirrubina para dentro do hepatócito ou inibir a conjugação dentro do fígado resultando em hiperbilirrubinemia.

Durante colestases hepática e pós hepática a elevação da bilirrubina total no soro pode ser observada devido ao retorno da bilirrubina conjugada para o sangue. Outras razões extra-hepáticas de colestase incluem hemólise, bilirrubinemia pré-hepática, e severo déficit de função hepática resultando na falha da excreção de bilirrubina para dentro do canalículo, bilirrubinemia pós-hepática (RAMAIAH, 2007). Enquanto diminuição nos valores de bilirrubina é indicativo de obstrução na secreção da bile (IWUANYANWU et al., 2010).

Entre os marcadores de injúria renal estão uréia (UREA) e creatinina (CREA) produtos do metabolismo do nitrogênio encontradas no sangue. A elevação destas enzimas fornecem indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou aumento do catabolismo protéico (CAMPELLO et al., 2009).

De acordo com Mariz (2007), os valores de referência (VRef) dos parâmetros bioquímicos, em ratas são; AST (76-100 U/L); ALT (45-61 U/L), ALP (57-61 U/L); UREA (52-62 mg/dL), CREA (0,4-0,6 mg/dL).

1.2 Toxicidade Reprodutiva

Na vida, a reprodução das espécies é uma das funções mais importante e corresponde a um processo natural que mais freqüentemente não precede sem problemas com destaque o uso de substâncias químicas que podem exercer efeitos tóxicos durante a gravidez, e em alguns casos a exposição materna pode levar a significativa exposição fetal resultante da circulação através da placenta (MILLER et al., 2004).

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

Os testes de avaliação de toxicidade reprodutiva e teratogenicidade geralmente compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal, após o nascimento e continuamente até sua maturação sexual (MÜLLER, 2011).

De forma que os estudos mais utilizados para estas avaliações são divididos em três segmentos que são adaptados de normas de Environmental Protection Agency (EPA) recomendadas pela Food and Drugs Administration (FDA) e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), são eles:

- a) Segmento I - toxicidade crônica, avalia os efeitos sobre a fertilidade de machos tratados antes e após o acasalamento, assim como de fêmeas durante a prenhez e lactação;
- b) Segmento II - toxicidade pré-natal, avalia as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie expostas durante a fase de organogênese;
- c) Segmento III - toxicidade peri e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação (HOLLENBACH, 2008).

A utilização de modelos animais para avaliação de possíveis efeitos da exposição a determinados agentes químicos sobre a função reprodutiva é imprescindível, pois diversos fatores como tempo, espaço, custo e principalmente

fatores éticos limitam estudos toxicológicos sobre a reprodução humana e animal (SANTOS, 2009).

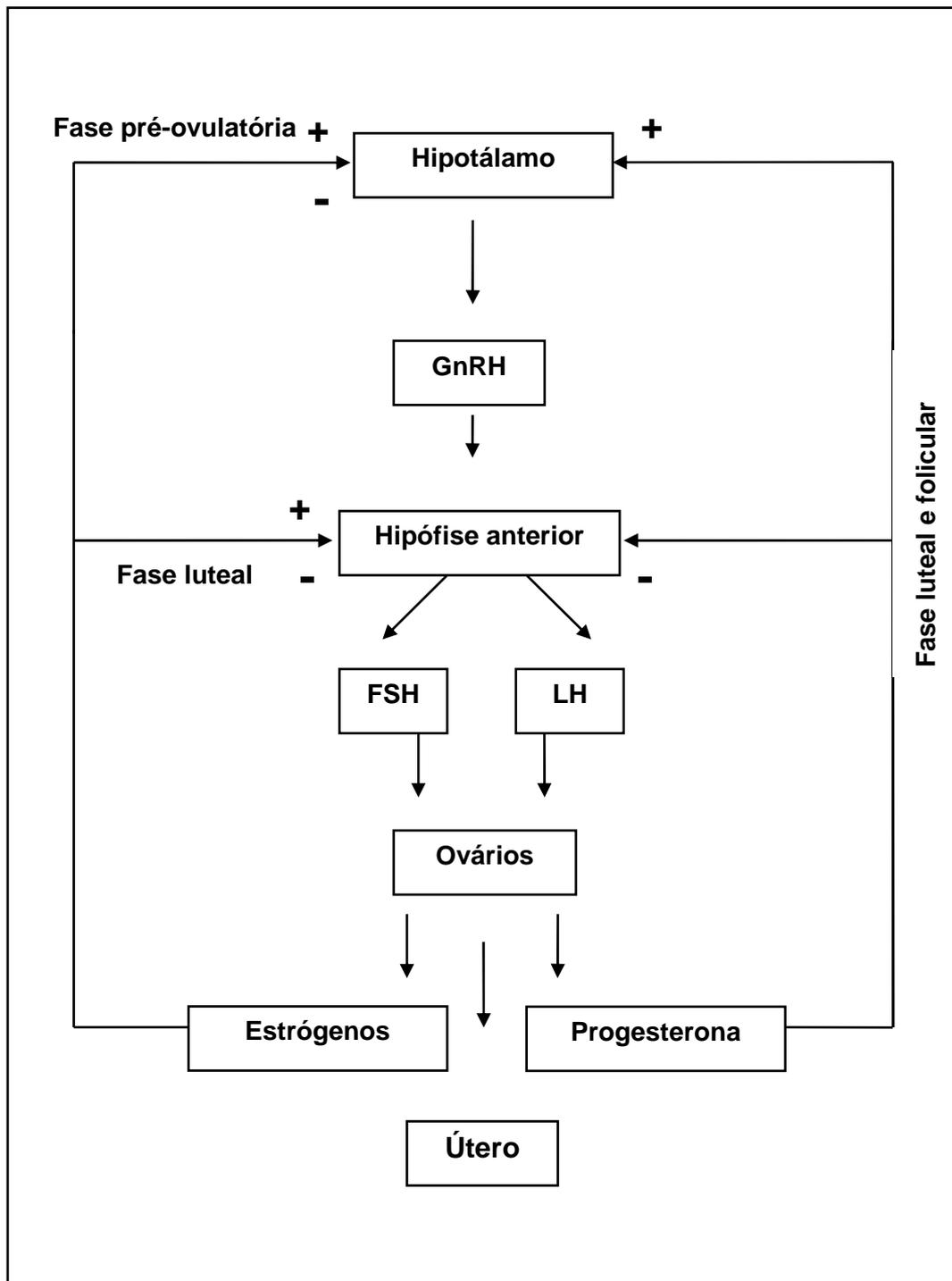
Entre os animais ratos, camundongos e coelhos reúnem diversas características que os tornam animais de escolha para sustentar os testes laboratoriais, como: período curto de gestação; prole numerosa; útero com dois cornos, nos quais os sítios de implantação tem distribuição regular e placenta tipo hemocorial, como no ser humano (MELLO; LANGELOH, 2006).

Quanto aos ratos, convencionalmente utiliza-se a espécie *Rattus norvegicus* e freqüentemente a linhagem Wistar. Nas fêmeas a maturidade sexual é atingida entre 60 e 75 dias de vida, fertilidade máxima entre 90 e 120 dias e a senescência reprodutiva se dá aos 360 dias de idade. O ciclo estral é regular, de natureza poliéstrica anual, com ciclos de 4 a 5 dias. O estro dura de 10 a 20 horas, com ovulação espontânea. O período de gestação dura de 20 a 22 dias, e o tamanho da prole varia entre 5 e 15 filhotes (HOLLENBACH, 2008).

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

As mudanças cíclicas que ocorrem no trato reprodutivo feminino são iniciadas e reguladas pelo eixo hipófise-hipotálamo-gônadas (WEINBAUER et al., 2008) como demonstra o ESQUEMA 1.

ESQUEMA 1 - Mecanismo de regulação hormonal do eixo hipófise-hipotálamo-gônadas



Fonte: (WEINBAUER et al., 2008, p.2). (+) - feedback positivo, (-) - feedback negativo, GnRH (hormônio liberador dos hormônios gonadotrópicos), LH (hormônio luteinizante), FSH (hormônio foliculo estimulante).

As alterações hormonais durante as fases do ciclo estral foram relatadas por Shivalingappa et al., (2002) e estão dispostas no QUADRO 1.

QUADRO 1 - Alterações hormonais durante as fases do ciclo estral

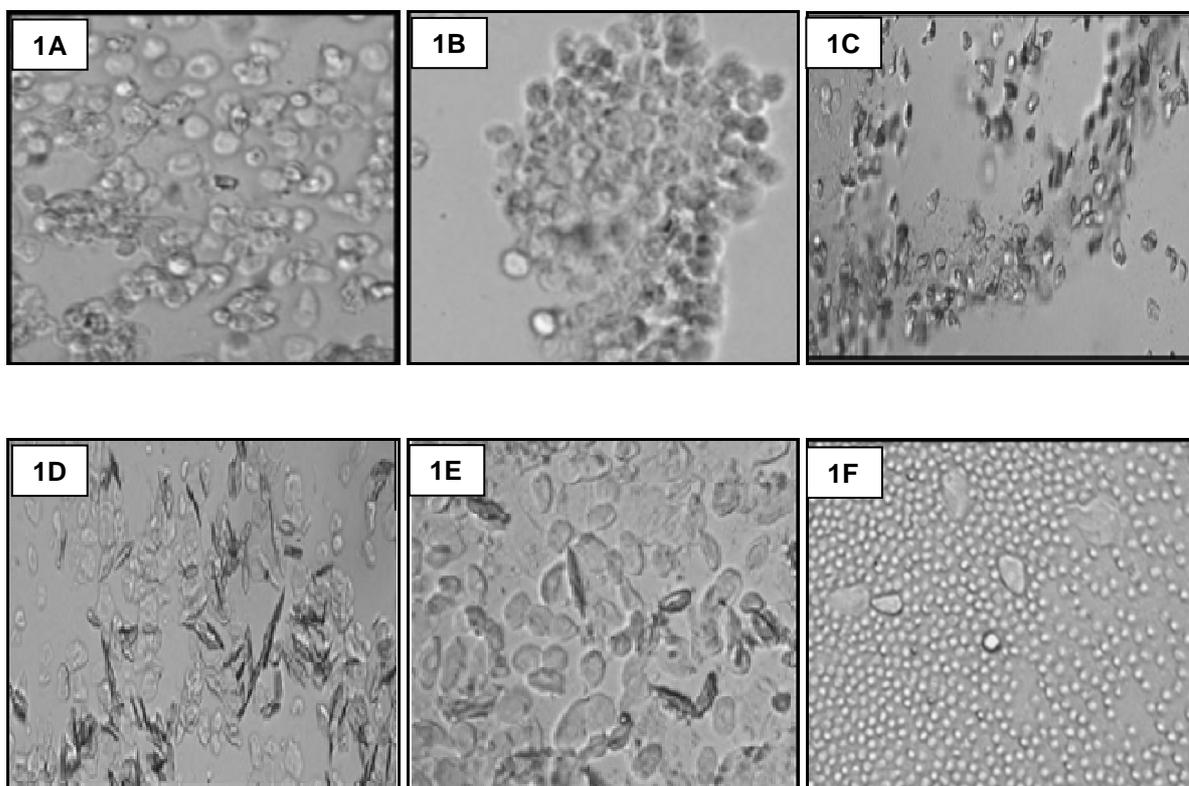
Fase do ciclo estral	Hormônios			
	Estrógeno	FSH	LH	Progesterona
Estro	↓	↓	↓	↓
Diestro	↑	↓↓	↓	↑
Proestro	↑↑	↑↑	↑	↑↑

Fonte: (SHIVALINGAPPA et al., 2002, p.14). (↓) - baixo, (↓↓) - mais baixo, (↑) - elevado, (↑↑) - mais elevado, FSH (hormônio foliculo estimulante), LH (hormônio luteinizante).

Na avaliação da toxicidade reprodutiva o ciclo estral de ratas, em razão de sua curta duração, 4 a 5 dias, constitui um bom modelo para o estudo das alterações que ocorrem durante o ciclo reprodutivo, que é caracterizado por 4 fases determinadas pelos tipos celulares observados no lavado vaginal, a saber (FIGURA 1): proestro (12h) – grande número de células nucleadas, arredondadas com aparência granular dispostas em grupos ou alinhadas como em fio; estro (14h) – as células são anucleadas, queratinizadas semelhantes a agulhas podem aparecer dobradas com borda irregular pontiaguda; metaestro (21h) – encontram-se células pavimentadas dobradas, algumas com aparência de agulha, pouco número de leucócitos e diestro (57h) – inúmeros leucócitos, muco e poucas células epiteliais dobradas (VANONI, 2006; GOLDMAN et al., 2007).

Alterações no ciclo causadas por tratamento com xenobióticos podem induzir aciclicidade caracterizada por persistente estro, diestro ou padrão irregular com ciclos de duração prolongada. Uma abordagem utilizada para resumir aciclicidade tem sido a percentagem de dias no estro e diestro dentro do grupo tratamento em cima do período de tempo utilizado. Se o efeito da exposição da substância testada persistir dentro do grupo, então ela prever informações úteis (GOLDMAN et al., 2007).

FIGURA 1 - Fases do ciclo estral. 1A, 1B, 1C - proestro; 1D – estro; 1E - metaestro e 1F - diestro



Fonte: (GOLDMAN et al., 2007, p.86).

Segundo Miller et al., (2004), o período gestacional em ratos apresenta o seguinte padrão básico de desenvolvimento: fertilização, clivagem e blastulação ocorrem no oviduto entre os dias 0 e 5 da gestação (GD 0-5), com implantação do embrião no útero entre GD 4-5. Entre os dias GD 5-10, a ectoderme, mesoderma e endoderma são formadas e tem início a organogênese. No GD 9, o coração inicia sua formação, ocorre fechamento da neuroderma e continua organogênese entre GD 10-14. Células germinativas primordiais alcançam o ápice de desenvolvimento no GD 11 e diferenciação sexual das gônadas ocorrem entre GD 12-15. O estágio tardio da gestação entre GD 14-19 é caracterizado por desenvolvimento e crescimento fetal, e formação óssea. De modo que, a exposição de substâncias químicas antes de GD 12 pode provocar efeitos significantes na organogênese e diferenciação sexual, enquanto exposição no estágio tardio de desenvolvimento, após GD 14, pode produzir efeitos no crescimento total como em sistemas orgânicos (MILLER et al., 2004).

O embrião começa com a fertilização do ovo, célula totipotente que passa por mitose e origina o blastocisto. A implantação do blastocisto corresponde a um processo complexo incluindo proliferação das células endometriais, decidualização, aumento do fluxo sanguíneo com enriquecimento de células imunes (MOUSA et al., 2008).

Para sucesso da implantação a interação entre o embrião e endométrio deve ser iniciada quando atingirem estágios precisos de desenvolvimento. O embrião deve atingir o estágio de blastocisto e mudanças dependente de hormônios, estrógenos e progesterona, e citocinas produzidos pelos trofoblastos devem ter ocorrido para resultar no desenvolvimento de curta receptividade do endométrio (KENNEDY, 1997; CARSON et al., 2000).

Desse modo, alterações hormonais como as produzidas pelo blastocisto após ovulação - no pós parto - provoca falha na implantação devido o estímulo do aspirar durante amamentação induzir alta secreção de prolactina, que suprime a secreção de gonadotropinas com conseqüente aumento de progesterona e baixa de estrógeno pelos ovários, isto desenvolve endométrio não receptivo, quando o estímulo é menor o inverso ocorre (CARSON et al., 2000).

A placenta, como órgão temporário que realiza comunicação entre mãe e feto, cresce rapidamente e exhibe mudanças em suas estruturas morfológicas de acordo com o desenvolvimento fetal. As funções das placentas mudam durante a gestação, entre elas, estão: suporte para desenvolvimento fetal na parede uterina; mediador da tolerância imune materna; mudanças da relação O_2 / CO_2 ; fornece nutrientes; remoção de resíduos do desenvolvimento fetal; barreira contra xenobióticos e liberação de hormônios esteróides e citocinas. Drogas ou substâncias químicas provocam injúrias ou desregulação da placenta, dependente do tempo de exposição e tipo de substância tóxica, que resultam em crescimento e desenvolvimento fetal anormal, reabsorção fetal ou teratogenicidade (FURUKAWA et al., 2011).

O período gestacional inclui pré-implantação, implantação, precoce pós-implantação, organogênese e período fetal. Em ratos o período pré-implantação e implantação ocorrem entre dias 3 a 4, e 5 a 6 após a fertilização, respectivamente (SALMAN et al., 2009).

Nos primeiros dias de desenvolvimento (2-5) o embrião permanece isolado no oviduto por oclusão das junções istmo-ampola e útero-tuba. Nesta região

há nutrientes e fatores específicos necessários para a sobrevivência e desenvolvimento da fase de blastocisto até abertura da junção útero-tuba e passagem do blastocisto para dentro do corno uterino (MAGANHA et al., 2006).

As condições hormonais maternas são necessárias para o bom desenvolvimento embrionário, sendo amplamente conhecido que os níveis sanguíneos de progesterona inadequados interferem com a viabilidade do embrião, por não permitirem que o endométrio esteja adequadamente preparado para sustentação da gestação. De maneira que os corpos lúteos, principais responsáveis pela secreção de progesterona, encontram-se aumentados de volume durante a gestação (NEPOMUCENO et al., 2005).

Enquanto agentes citotóxicos interrompem a gestação possivelmente interferindo com a divisão mitótica dos fetos, substâncias químicas interferem antes e após do processo de implantação podendo resultar em perda embrionária pré e pós-implantação (YAKUBU; BUKOYE, 2009).

Entre os mecanismos de falência na implantação embrionária relacionados com a exposição maternal a agentes químicos destacam-se: alterações morfológicas no embrião que interferem com a implantação ou promovem embriofetividade; modificação nos níveis hormonais, assim interferindo com a implantação embrionária; alteração das condições uterinas necessárias para a nidificação, ou distúrbios no transporte tubário e conseqüente interferência com o tempo correto de chegada do blastocisto no útero (CUMMINGS, 1990; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2004).

Perda pré-implantação correlaciona proporção entre o número de corpos lúteos e o número de implantes. A diferença entre o número de corpos lúteos e número de implantes representa o número de perda pré-implantação. A implantação correlaciona a proporção entre o número de sítio de implantação e o número de corpos lúteos. Como resultado da ação do corpo lúteo sobre o folículo ovulatório que provavelmente libera um oócito, o índice de implantação é um caminho indireto para observar o número de ovulação que resultam em ovócitos fertilizados e blastocistos implantados. A partir da implantação, o embrião pode continuar seu desenvolvimento normal, desenvolver-se anormalmente ou morrer. A morte do embrião após implantação é observada como reabsorção, que é caracterizada como lise "in situ" do embrião ou feto. As reabsorções correlacionam a proporção entre o número de reabsorção e o número de implantes viáveis (os que contém um feto

vivo) - quanto maior esta proporção maior é o número de embriões mortos (MAGANHA et al., 2006).

A ocorrência de reabsorção fetal sugere que a interrupção da gravidez ocorre após a implantação e é indicativo de falha do desenvolvimento do embrião que pode ser devido a falha na função do revestimento uterino ou toxicidade materna que pode aumentar a reabsorção fetal e provocar morte fetal tardia. O aumento da perda pós-implante sugere efeito anti-implantação e enfatiza propriedades abortivas e de reabsorção fetal (YAKUBU; BUKOYE, 2009).

As características do conceito e sua capacidade de desenvolvimento e maturação são expressões da capacidade de fertilização de células germinativas, concepção bem sucedida e o subsequente desenvolvimento intra-uterino. O desenvolvimento peri e pós-natal depende do potencial de desenvolvimento do indivíduo e de sua habilidade de enfrentar variadas circunstâncias ambientais (MELLO; LANGELOH, 2006; HOLLENBACH, 2008).

Durante a gestação, o peso das ninhadas pode ser influenciado pela capacidade uterina, pelo tamanho da ninhada e pela duração da gestação. Após o nascimento, além da habilidade da fêmea, o efeito de substâncias químicas pode comprometer o desenvolvimento (MELLO, 2001).

Os fetos são frequentemente suscetível a exposição aos toxicantes devido a fragilidade do estágio de desenvolvimento e a falta de mecanismos de defesa (MILLER et al., 2004).

1.3 Toxicidade nas plantas medicinais

1.3.1 Família Leguminosae

A família Leguminosae (Fabaceae s.l.) constitui uma das maiores famílias de angiospermas, juntamente com Orchidaceae e Asteraceae. Atualmente são reconhecidos para esta família 727 gêneros e 19.325 espécies. Encontra-se dividida em três sub-famílias: Caesalpinioideae que compreende cerca de 2.250 espécies, as Mimosoideae com 3.270 espécies e Papilionoideae com 13.800 espécies (LEWIS et al., 2005).

Segundo Lima (1994) as sub-famílias Caesalpinioideae e Mimosoideae predominam em regiões tropicais e sub-tropicais sendo preferencialmente

megatérmicas enquanto Papilionoideae (Faboideae) ocorrem em regiões temperadas e temperado-cálidas sendo mega, meso e microtérmicas permitindo caracterizar a família Leguminosae por plasticidade ecológica com centros de biodiversidade em diferentes tipos de habitat com clima, solos e topografias variados.

No Brasil, a família Leguminosae está inclusa entre os componentes de biodiversidade do Brasil com áreas de dispersão nas regiões norte, centro-oeste e nordeste principalmente nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará (BEZERRA; FERNANDES; CHAVES, 2011) com registro de aproximadamente 188 gêneros e 2100 espécies (LIMA, 2000).

1.3.2 Gênero *Parkia*

O gênero *Parkia*, subfamília Mimosoideae, é encontrado principalmente em floresta tropical úmida, onde existem aproximadamente 17 espécies que ocorrem em áreas de floresta de terra firme, várzea sazonal e floresta secundária (HOPKINS, 1986).

Análises fitoquímicas em extratos obtidos de espécies pertencentes ao gênero *Parkia* tem demonstrado a presença de importantes princípios ativos descritos no QUADRO 2. Enquanto os estudos farmacológicos tem demonstrado importantes propriedades terapêuticas (QUADRO 3).

QUADRO 2 - Estudos fitoquímicos de extratos obtidos de espécies pertencentes ao gênero *Parkia*

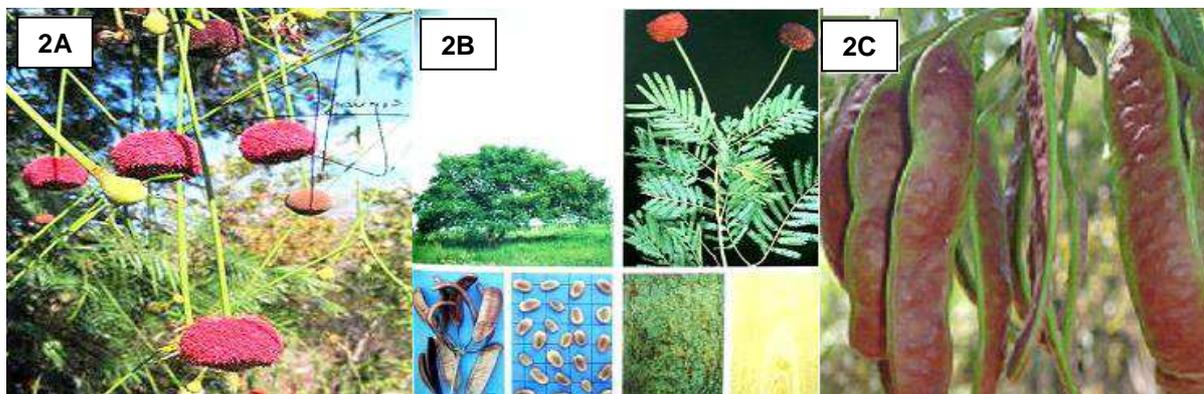
Espécie	Extrato	Princípio ativo	Referências
<i>P. biglobosa</i> e <i>P. bicolor</i>	hexânico, acetato de etila, etanólico e aquoso de folhas	glicosídeos cardíacos, esteróides, taninos e alcalóides	(AJAYEOBA, 2002)
<i>P. biglobosa</i>	acetato de etila e etanólico de cascas do caule	ésteres do ácido ferúlico (ácido trans-ferúlico e cis-ferulato), tri- terpenos (lupeol) e catequinas (4- 0-metil-epi-galocatequina, epi-galo catequina, epicatequina-3-0- galato e epi-galocatequina-3-0- galato	(TRINGALI; SPATAFORA; LONGO, 2000)
<i>P. biglobosa</i>	óleo de sementes	campesterol, estigmasterol β -sitosterol	(AKINTAYO, 2004)
<i>P. pendula</i>	etanólico de folhas	flavonóides, triterpenos (β -amirina e lupeol), derivados ArC ₁ , derivados C ₁₃ carotenóides, esteróides e monoacilglicerídeo	(FONSECA et al.,2006)
<i>P. speciosa</i> <i>P. javanica</i> <i>P. discolor</i> <i>P. platycephala</i>	sementes	lectinas	(DEL SOL et al., 2005).

QUADRO 3 - Estudos farmacológicos de extratos obtidos de espécies pertencentes ao gênero *Parkia*

Espécie	Extrato	Propriedade farmacológica	Referências
<i>P. biglobosa</i>	aquoso e metanólico de sementes fermentadas	antidiabética antihiperlipidêmica antiagregante plaquetário	(ODETOLA et al., 2006) (RENDU; SALEUN; AUGER, 1993)
<i>P. biglobosa</i>	fração hexânica de cascas hidrometanólico de cascas hidrometanólico de folhas hidrometanólico de cascas extrato bruto semi-etanólico	analgésica antiinflamatória antiofídica imunomoduladora antidiarréica moduladora de corticóides	(KOUADIO et al., 2000) (ASUZU, HARVEY, 2003) (OSADEBE; OMEJE, 2009) (AGUNU et al., 2005) (KODJO et al., 2006)
<i>P. biglobosa</i>	hexânico diclorometano acetato de etila e aquoso de cascas	tratamento do distúrbio cognitivo	(HAGE, 2010)
<i>P. biglobosa</i> e <i>P. bicolor</i>	acetato de etila, etanólico e aquoso de folhas	antibacteriana	(AJAYEOBA, 2002)
<i>P. pendula</i>	NaCl 10% de sementes	anti-viral	(FAVACHO et al., 2007)
<i>P. clappertoniana</i>	sementes	hepatoproteção	(IWUANYANWU et al., 2010)

1.3.3 *Parkia platycephala* BENTH

FIGURA 2 - *Parkia platycephala* BENTH (partes da planta): 2A - flores, 2B - planta completa com destaque para folhas, 2C - frutos



Fonte: (AMORIM, 2010, p.35).

A *Parkia platycephala* BENTH é conhecida popularmente como faveira, faveira-preta, visgueira e fava-de-bolota. É uma árvore de folhas bipinadas, folíolos pequenos, vernucosos; flores vermelhas-escuras, dispostas em capítulos esféricos de 4-5 cm com pedúnculos filiformes de 30 cm; fruto em forma de vagem oblonga, indeiscente, um pouco carnosa, contendo as sementes (CORRÊA, 1952), cujas vagens são muito utilizadas na suplementação alimentar para ruminantes, especialmente caprinos e bovinos, nas áreas de cerrado (CAVADA et al., 2006).

Lectinas encontradas nas sementes de *Parkia platycephala* Benth foram capazes de estimular a liberação de histamina de mastócitos de ratos *Wistar* de maneira dependente de concentração (LOPES et al., 2005).

Estudos fitoquímicos demonstraram fenóis totais, flavonóides e terpenos em extrato etanólico e frações das folhas de *Parkia platycephala* BENTH. Os altos teores dos fenóis totais em equivalente de ácido gálico por g de amostra (EAG) observados no extrato etanólico ($429,89 \pm 16,00$), frações aquosa ($546,44 \pm 18,07$) e acetato de etila ($402,22 \pm 12,39$) justificam atividade antioxidante do EtOH-Pp (BEZERRA, 2009; BEZERRA; CARVALHO; CHAVES, 2011).

Segundo Fernandes (2009) em estudo de toxicidade aguda o extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) na dose 2g/kg via oral não demonstrou nenhum sinal de toxicidade evidente como alterações de comportamento ou morte dos animais, no período de 72 horas.

A partir de modelos de lesões gástricas em camundongos e ratos induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado foi observada atividade gastroprotetora do EtOH-Pp nas doses 125 e 250 mg/kg com participação da via NO sintase e redução da acidez titulável da secreção gástrica que indica atividade antissecretória no mecanismo de gastroproteção evidenciada. No modelo de isquemia e reperfusão (I/R) o EtOH-Pp demonstrou proteção gástrica sugerindo envolvimento de mecanismos antioxidantes, por aumento da catalase. (FERNANDES, 2009).

O EtOH-Pp apresentou efeito antinociceptivo em ratos no modelo de neuropatia diabética avaliada por estímulo mecânico durante tratamento crônico com extrato etanólico, com maior limiar da dor na dose 300mg/kg, e por estímulo mecânico e químico após tratamento agudo com a fração acetato de etila, na dose 50 mg/kg (AMORIM, 2010).

1.4 Escolha de doses em toxicidade sistêmica e reprodutiva

Devido a possibilidade de diferenças nas sensibilidades às substâncias químicas entre fêmeas não prenhas, prenhas e em lactação, as doses para obter toxicidade sistêmica devem diferir. Este problema pode ser resolvido parcialmente com uso de mais que três níveis de doses (REUTER et al., 2003).

As seqüências decrescentes dos níveis de doses devem ser determinadas com critério para demonstrar alguma relação dose-resposta e não apresentar efeitos adversos na maior dose (NOAEL dose “no observed adverse effect level”). No entanto, a menor dose deve demonstrar efeitos tóxicos e não levar à morte ou danos severos (LOAEL dose “lowest observed adverse effect level”). Teste com dose limite mínima de 1000mg/kg com intervalos de dois ou quatro entre os níveis de doses deve ser realizado, porém se efeitos tóxicos não forem observados, não há necessidade de se estabelecer níveis decrescentes de doses (OECD,1995).

Diante do exposto e da necessidade de pesquisas científicas para validar o uso da espécie *Parkia platycephala* Benth com eficácia e segurança, possibilitando que venha tornar-se um medicamento fitoterápico, o extrato de *Parkia platycephala* Benth foi submetido à estudos de toxicidade para atender as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, RDC nº 48 que dispõe sobre o registro de

medicamentos fitoterápicos e RE nº90 que traz o guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, ambas de 16 de março de 2004.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a toxicidade do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth sobre parâmetros sistêmicos e reprodutivos, em ratas Wistar.

2.2 Objetivos específicos:

- 1 Demonstrar a toxicidade do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth, nas diferentes doses, sobre o ciclo estral em ratas Wistar.
- 2 Verificar a toxicidade sistêmica do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth, nas diferentes doses, em ratas Wistar não prenhas, analisando os seguintes parâmetros séricos: AST, ALT, ALP, UREA, CREA e BIL D, BIL IND e BIL T.
- 3 Averiguar a toxicidade sistêmica do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth, nas diferentes doses, em ratas Wistar não prenhas, por meio de massa corporal, consumo de água, ração, massas absolutas e relativas dos órgãos como a hipófise, adrenais, coração, fígado, rins, baço, ovários, útero em relação ao cérebro.
- 4 Observar a toxicidade sistêmica do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth, nas diferentes doses, em ratas Wistar não prenhas, por meio da análise histopatológica do coração, fígado, rins, ovários, útero e cérebro.
- 5 Demonstrar a toxicidade reprodutiva do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth, nas diferentes doses, em ratas Wistar prenhas, durante estágios de implantação e organogênese.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta e identificação do material vegetal

A coleta foi realizada na cidade de Caxias – MA, no mês de Outubro de 2010. O material representativo da planta foi encaminhado ao Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, onde após sua identificação, a exsicata foi depositada sob o número 27.869.

3.2 Preparo do extrato

O extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) foi preparado a partir de folhas secas, em estufa a 45°C, submetidas à pulverização em moinho elétrico totalizando 2.400g de pó. Esse material em seguida passou por processo de maceração em etanol P.A, durante 72 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, procedimento repetido com troca do solvente por sete vezes. Posteriormente o extrato foi concentrado em rotavapor a 50° C e liofilizado, sendo então acondicionado em frasco de vidro âmbar e conservado na geladeira.

3.3 Animais

Utilizou-se 64 ratas Wistar adultas pesando entre 180 – 220 g, criadas e mantidas no Biotério de Experimentação do Departamento de Morfofisiologia Veterinária (Biotex) do Centro de Ciências Agrárias (CCA). Os animais foram mantidos em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, em gaiolas individuais, em sala com ar condicionado e livre acesso à água e ração (FRI-LAB Ratos – Fri-Ribe).

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI), protocolo número 33/2009.

Todos os protocolos experimentais foram elaborados e desenvolvidos com base nos princípios dos três “R”s (Reduction, Replacement e Refinement) e não se sobrepuseram em relação aos objetivos do estudo. Além disso, os animais foram manipulados somente quando necessário e por pesquisadores treinados de maneira

que não foi permitido exposição à dor ou estresse causado por ruído, falta de alimento, água ou variação de temperatura.

3.4 Protocolo experimental

3.4.1 Desenho experimental farmacológico

O desenho experimental farmacológico constou de quatro grupos com oito animais (n=8), sendo eles: grupo veículo ao qual foi administrado água destilada e três grupos que receberam extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp), por via gástrica, volume de 10mL/kg de peso corporal, perfazendo doses de 250, 500 e 1000 mg/kg de peso corporal, preparados e administrados diariamente durante trinta dias nos protocolos de toxicidade do ciclo estral e sistêmica e dezoito dias no protocolo de toxicidade reprodutiva.

3.4.2 Toxicidade no ciclo estral

O protocolo utilizado para avaliação da toxicidade no ciclo estral foi adaptado da metodologia desenvolvida por Vanoni et al., (2006) e Goldman et al., (2007).

Na avaliação da toxicidade do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) durante o ciclo estral, foram utilizadas 32 ratas Wistar não prenhas, pesando entre 180-220g. Todas as ratas foram examinadas diariamente, entre 8:00 e 9:00 horas, inicialmente por sete dias para verificar se estavam ciclando normalmente e somente aqueles com ciclo regular foram incluídas no experimento. Em seguida, as ratas foram divididas ao acaso em quatro grupos experimentais de oito animais cada, e logo em seguida iniciou-se o período de tratamento de acordo com o protocolo experimental farmacológico, durante 30 dias.

Para avaliação do ciclo estral, a secreção vaginal foi coletada com uma pipeta plástica contendo aproximadamente 10µL de salina (NaCl a 0,9 %) e depositada sobre uma lâmina de vidro para microscopia e analisada por meio de microscopia de luz, nas objetivas de 10 e 40x.

Na determinação da frequência das fases do ciclo estral a soma dos números de ocorrências das fases registradas durante o período do tratamento foi

utilizada como parâmetro para análise. O intervalo interestro foi calculado a partir da soma dos números de dias entre os estros, dividido pelo total de dias do tratamento. O índice de diestro foi calculado a partir da soma dos números de ocorrência do diestro dividido por todos os dias do tratamento, em percentagem.

3.4.3 Toxicidade sistêmica

Concomitantemente com a avaliação do ciclo estral, os mesmos animais foram avaliados utilizando o protocolo adaptado à metodologia desenvolvida por Park et al., (2010), onde se seguiram os parâmetros:

3.4.3.1 Consumo de água e ração

O consumo de água (mL) e ração (g) dos animais tratados foi aferido em gaiola individual nos dias 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 após o início do tratamento. Nos dias anteriores as aferições, foi oferecida a cada gaiola quantidade de ração (50g) e água (250mL). O consumo diário de cada animal foi registrado a partir da diferença entre a quantidade oferecida e o restante registrado.

3.4.3.2 Massa corpórea

O parâmetro massa corpórea (g) dos animais tratados foi aferido nos dias 0, 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 e 29 após o início do tratamento. O dia 0 significa dia anterior ao primeiro tratamento. A massa corpórea dos animais no dia posterior ao término do tratamento (Dia 31) foi registrada.

3.4.3.3 Parâmetros bioquímicos

Ao final do tratamento com o EtOH-Pp, as ratas foram anestesiadas com uma associação de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (11,5 mg/kg), procedida a coleta de sangue por meio de punção cardíaca, em frascos sem anticoagulante, adicionados de ativador de coágulo (BD- Vacuette Z serum clot activator), para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 3500 rpm por cinco minutos e o soro separado. As determinações bioquímicas (AST, ALT, UREA) foram realizadas por química seca (Reflotron, Roche Diagnostics Brasil) e ALP, CREA e BIL D, BIL IND e BIL T em Analisador Bioquímico Semi-automatizado, RA-50 (Bayer), utilizando kits Labtest (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil).

3.4.3.4 Aspectos macroscópicos e massas dos órgãos

Após a coleta de sangue, as ratas foram eutanaziadas, por excesso dos mesmos anestésicos, e necropsiadas. A hipófise, adrenais, coração, fígado, rins, baço, ovários e útero dos animais tratados foram removidos, avaliados macroscopicamente quanto à cor, morfologia; suas massas absolutas foram aferidas e calculadas as respectivas massas relativas em relação ao cérebro. O material foi então fixado em solução tamponada neutra de formol a 10% até o processamento para avaliação histológica.

3.4.3.5 Análise histopatológica

Após 24 horas de fixação em formalina tamponada a 10%, os órgãos foram recortados desidratados em séries crescentes de álcool (70 a 100%); diafanização em xilol; impregnação e inclusão em parafina. Os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 5,0 μ M e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio de luz.

3.4.3.6 Toxicidade reprodutiva nos estágios de implantação e organogênese

O protocolo utilizado para avaliação da toxicidade reprodutiva nos estágios de implantação, organogênese foi adaptado das metodologias desenvolvidas por Maganha et al., (2006) e Yakubu; Buboye, (2009).

Para avaliar a toxicidade gestacional do EtOH-Pp, as ratas foram examinadas diariamente quanto à fase do ciclo estral, através de esfregaço vaginal a fresco e aquelas detectadas em proestro foram acasaladas com um macho fértil na proporção 2:1 e a presença de espermatozoides no esfregaço da manhã seguinte ao acasalamento foi tomada como indicativo de prenhez (1^o dia). Uma vez prenhes,

as ratas foram divididas ao acaso, e tratadas conforme grupos determinados pelo desenho experimental farmacológico do 1º ao 19º dia de gestação, em gaiolas individuais.

Após o período de tratamento, no 20º dia de gestação, as ratas foram anestesiadas com uma associação de cetamina e xilazina, na dose 50 mg de cetamina + 11,5mg de xilazina por kg de peso corporal. O útero gravídico foi removido com seus conteúdos e realizou-se a contagem do número de fetos vivos e mortos. Os animais foram eutanaziados por sobredose dos mesmos anestésicos e, em seguida, foi avaliada a massa fetal individual e da ninhada.

Realizou-se a pesagem das placentas de todos os fetos, e em seguida os fetos foram examinados macroscopicamente e com auxílio de uma lupa, quanto à presença de anomalias e/ou malformações congênitas. Nos úteros foi feita a contagem dos sítios de implantação embrionária, nos dois cornos, após a remoção dos fetos. Os ovários foram removidos e procedida a contagem de corpos lúteos, com auxílio de uma lupa.

As perdas pré-implante e pós-implante e os índices de implantação e reabsorção foram calculados por meio das fórmulas:

- **ÍNDICE DE IMPLANTAÇÃO** = $(n^{\circ} \text{ implantações} / n^{\circ} \text{ corpos lúteos}) \times 100$;
- **ÍNDICE DE REABSORÇÕES** = $(n^{\circ} \text{ reabsorções} / n^{\circ} \text{ implantes}) \times 100$;
sendo o nº de reabsorções = $(n^{\circ} \text{ implantes}) - (n^{\circ} \text{ filhotes nascidos})$.
- **PERDAS PRÉ-IMPLANTAÇÃO** = $(n^{\circ} \text{ de corpos lúteos} - n^{\circ} \text{ de implantes} / n^{\circ} \text{ de corpos lúteos}) \times 100$;
- **PERDAS PÓS-IMPLANTE** = $(n^{\circ} \text{ de implantes} - n^{\circ} \text{ de nativos} / n^{\circ} \text{ de implantes}) \times 100$.

3.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA one-way), seguida por teste de Tukey, para comparação de médias, adotando-se um nível de significância de 5%. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na literatura não foram encontrados registros de estudos sobre toxicidade sistêmica e reprodutiva de *Parkia platycephala* Benth, assim este estudo com o EtOH-Pp buscou estabelecer doses para observar possíveis efeitos tóxicos sobre parâmetros sistêmicos e reprodutivos em ratas não prenhas e nos parâmetros reprodutivos em ratas prenhas.

As doses utilizadas 250, 500 e 1000mg/kg cresceram em progressão aritmética de razão dois, na tentativa de estabelecer a maior dose que não manifesta efeito tóxico (NOAEL) e menor dose que apresenta efeito tóxico sem levar à morte (LOAEL), e obedecendo ao limite 1000mg/kg, para testes toxicológicos, em conformidade com a OECD 407 (OECD, 1995). Além do mais, a escolha da maior dose teve como base o fato de estar abaixo da DL50, que segundo a toxicidade aguda do EtOH-Pp realizada por Fernandes, (2009) deve ser superior à dose de 2000mg/kg, visto que nesta não foi detectado morbidade nem mortalidade.

Compostos fenólicos como flavonóides, substâncias potencialmente ativas, foram descritos no EtOH-Pp (BEZERRA, 2009). Além dessas, outras substâncias como esteróides, taninos, saponinas, glicosídeos cardíacos já que foram encontradas no gênero *Parkia* segundo Ajaiyeoba, (2002) e podem ser responsáveis por atividades terapêuticas ou tóxicas sobre parâmetros sistêmicos e reprodutivos (PANDEY et al., 2011).

4.1 Toxicidade no ciclo estral

A avaliação do ciclo estral constitui-se em importante ferramenta de avaliação da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e conseqüentemente para o estudo da toxicologia reprodutiva, pela facilidade e fidelidade da avaliação (GOLDMAN et al., 2007). Neste experimento (TABELA 2), observou-se que a frequência da fase de proestro foi significativamente reduzida entre as doses de 500 e 1000mg/kg em relação ao veículo. Por outro lado, o diestro apresentou aumento significativo em sua frequência nas doses 500 e 1000mg/kg, em relação ao veículo, além disso, o índice de diestro demonstrou aumento significativo na dose de 1000mg/kg em relação ao veículo. A frequência das fases de estro e metaestro bem como o intervalo interestro não sofreram alterações significativas.

TABELA 2 - Toxicidade no ciclo estral quanto a frequência de suas fases e intervalo interestro após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) nas diferentes doses

Fase	Frequência das fases do ciclo estral			
	Tratamento			
	Veículo (H ₂ O)	EtOH-Pp 250mg/kg	EtOH-Pp 500mg/kg	EtOH-Pp 1000mg/kg
Proestro	7,375 ± 0,263	6,750 ± 0,250	5,500 ± 0,423 ^a	5,750 ± 0,313 ^a
Estro	7,375 ± 0,324	7,125 ± 0,350	6,750 ± 0,453	6,500 ± 0,500
Intervalo interestro	4,093 ± 0,194	4,423 ± 0,316	4,775 ± 0,293	5,068 ± 0,525
Metaestro	8,125 ± 0,549	8,000 ± 0,423	7,750 ± 0,366	7,375 ± 0,375
Diestro	8,125 ± 0,295	9,125 ± 0,895	11,000 ± 0,707 ^a	11,375 ± 0,905 ^a
Índice de diestro (%)	26,200	29,438	30,587	38,338 ^a

Os dados representam a média ± erro padrão da média dos animais, n = 8. Proestro, diestro e índice de diestro (^a p < 0,05 vs. veículo).

Os resultados demonstram uma provável toxicidade reprodutiva do EtOH-Pp nas doses utilizadas, ao alterar a frequência das fases do ciclo estral. Essas alterações podem ser explicadas possivelmente a partir da presença de substâncias ativas no EtOH-Pp que podem apresentar ação inibitória sobre o eixo hipotálamo-hipófise, produzindo irregularidades na duração das fases do ciclo estral, semelhante ao observado em tratamento de camundongas com progestágeno onde foram observados aumento de diestro e redução de proestro (BAKRY et al., 2010).

Tais substâncias podem ser compostos esteróides possivelmente presentes no extrato em estudo (EtOH-Pp), semelhantes aos previamente descritos no gênero *Parkia* (AJAIYEGBA, 2002), que podem se ligar a receptores de esteroides sexuais e produzir efeito semelhante ao dos progestágenos e estrógenos, inibindo o eixo hipotálamo-hipófise, com conseqüente redução do crescimento folicular e da frequência de proestros.

Essas características devem ser investigadas quanto à possibilidade do EtOH-Pp apresentar efeitos contraceptivos conforme sugerem Lortlar et al., (2010) e na pesquisa sobre efeitos contraceptivos de progesterona no endométrio e ovários Bakry et al., (2010) em estudo dos efeitos da depo-provera no ciclo estral de rata.

4.2 Toxicidade sistêmica

4.2.1 Aferição do consumo de água, ração e massa corpórea

Os resultados do efeito do EtOH-Pp sobre consumo diário de água (mL), ração (g) e massa corpórea (g) durante o período de avaliação do ciclo estral, estão dispostos na TABELA 3. Pode-se notar reduções significativas no consumo de água e ração nas doses 500 e 1000mg/kg em relação ao veículo, e na dose de 250mg/kg no consumo de água. Quanto à massa corpórea os efeitos do EtOH-Pp mostram diminuição significativa nas doses 500 e 1000mg/kg, em relação ao veículo.

TABELA 3 - Aferição do consumo de água, ração e massa corpórea das ratas após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) nas diferentes doses

Parâmetro	Aferição			
	Tratamento			
	Veículo (H ₂ O _d)	EtOH-Pp 250mg/kg	EtOH-Pp 500mg/kg	EtOH-Pp 1000mg/kg
Água	24,930 ± 1,215	22,130 ± 0,886 ^a	20,830 ± 0,493 ^a	23,800 ± 1,201 ^a
Ração	14,750 ± 0,307	13,200 ± 0,401	11,920 ± 0,545 ^a	12,310 ± 0,438 ^a
Massa corpórea	208,200 ± 1,578	204,000 ± 0,709	194,700 ± 1,714 ^a	202,500 ± 0,575 ^a

Os dados representam a média ± erro padrão da média dos animais, n=8. (^a p < 0,05 vs. veículo).

O efeito do EtOH-Pp na diminuição no consumo de água pode ser explicado pela possível presença de compostos fenólicos, descritos por Bezerra, (2009), que diminuem a ingestão de água por alterar palatabilidade e não por efeitos tóxicos diretos dessas substâncias (CAMPBELL et al., 2009).

Além disso, a diminuição no consumo de água induzida pelo EtOH-Pp pode ter provocado desidratação e hiperosmolemia. Essa hiperosmolemia pode ter provocado aumento de saciedade e a interrupção brusca da alimentação, atuando em regiões de controle hipotalâmico da ingestão, segundo Watts; Boyle (2010). Desse modo, a desidratação provocada por diminuição da ingestão de água pode ter provocado redução da massa corpórea, seja pela desidratação em si, pela

diminuição da ingestão de ração ou ainda por uma provável decomposição dos tecidos em mecanismo fisiológico para geração de água metabólica (CAMPBELL et al., 2009).

O extrato EtOH-Pp pode ter provocado redução da ingestão de ração por meio de alterações dos hormônios gastrintestinais, que atuam como neurotransmissores dentro do sistema nervoso central no controle da ingestão de alimentos, por ação periférica em receptores específicos (QUADRO 4) como relata Suzuki et al., (2010) no estudo sobre o papel dos hormônios e hipotálamo na regulação do hipotálamo.

QUADRO 4 - Efeitos dos hormônios gastrintestinais na ingestão de alimentos: receptores e sítios de maior secreção

Hormônios gastrintestinais	Efeito na ingestão	Receptor	Sítios de maior secreção
PYY	↓	Y2	Células L no intestino
PP	↓	Y4, Y5	Células PP no pâncreas
GLP - 1	↓	GLP - 1	Células L no intestino
OXM	↓	GLP - 1	Células L no intestino
Glucagon	↓	GCGR	Células α pancreática
CCK	↓	CCK 1, 2	Células I do pequeno intestino
Amilina	↓	AMY 1 - 3	Células β pancreática

Fonte: (SUZUKI et al., 2010, p. 362). (↓) - redução; PYY – peptídeo YY; PP – polipeptídeo pancreático; GLP – 1 – peptídeo 1 ligante de glucagon; OXM – oxintomodulina; CCK – colecistocinina; GCGR – receptor de glucagon.

O extrato em estudo pode ainda ter influenciado diretamente o sistema nervoso central na redução do apetite atuando em receptores MC – 3/4 (melanocortina 3/4) da população de neurônios α - MSH (hormônio estimulante de α -melanócitos), e CART (transcritos relacionados a cocaína e anfetamina) do núcleo arqueado, que por situar-se em região da eminência mediana, área de barreira hematoencefálica incompleta pode sofrer influências de fatores circulantes via corrente sanguínea como relata Chaudhri et al., (2006) em estudo sobre hormônios gastrintestinais na regulação do apetite.

4.2.2 Parâmetros bioquímicos

Os resultados do efeito do EtOH-Pp quanto às análises de parâmetros bioquímicos estão dispostos na TABELA 4. Observa-se que as dosagens séricas de AST e ALT não demonstraram alterações significativas entre os grupos tratados com extrato e o veículo. Observou-se inclusive que seus valores no soro foram inferiores aos valores de referência, o que demonstra não toxicidade hepática do extrato conforme sugerem Mukinda et al., (2007) em estudo de toxicidade aguda e crônica de *Artemisia afra* em ratos e Oluduro; Aderiye, (2009) ao avaliarem os efeitos do extrato *Moringa oleifera* nas atividades de enzimas em ratos albinos. Fato corroborado com as dosagens das bilirrubinas total, direta e indireta que também não demonstraram diferenças significativas entre os grupos.

TABELA 4 - Análises bioquímicas de AST, ALT, ALP, BIL T, BIL D, BIL IND, UREA, CREA em soro de ratas após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) nas diferentes doses

Análises Bioquímicas					
PR	VRef	Tratamento			
		Veículo (H ₂ O d)	EtOH-Pp 250mg/kg	EtOH-Pp 500mg/kg	EtOH-Pp 1000mg/kg
AST	76-100	60,633 ± 2,082	74,417 ± 5,901	65,167 ± 3,832	69,400 ± 2,440
ALT	45-61	34,967 ± 1,684	37,883 ± 3,694	34,850 ± 3,296	28,933 ± 3,017
ALP	57-61	39,250 ± 5,799	68,375 ± 10,765	90,500 ± 13,639 ^a	89,500 ± 4,668 ^a
BIL D	-	0,225 ± 0,056	0,163 ± 0,026	0,188 ± 0,040	0,200 ± 0,038
BIL IND	-	0,575 ± 0,121	0,638 ± 0,096	0,712 ± 0,074	0,675 ± 0,080
BIL T	-	0,800 ± 0,093	0,925 ± 0,136	1,000 ± 0,127	0,875 ± 0,077
URÉIA	52-62	47,750 ± 1,968	48,225 ± 1,009	44,187 ± 2,137	43,513 ± 1,160
CREA	0,4-0,6	0,375 ± 0,065	0,325 ± 0,031	0,400 ± 0,033	0,388 ± 0,030

Os dados representam a média ± erro padrão da média, n = 8. ALP: (^a p < 0,05 vs. veículo). AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e ALP (fosfatase alcalina) em U/L, BIL D (bilirrubina direta), BIL IND (bilirrubina indireta), BIL T (bilirrubina total), UREA, CREA (creatinina) em mg/dL, PR (parâmetro), VRef (valores de referência).

Um significativo aumento nos níveis da fosfatase alcalina (ALP) após exposição ao EtOH-Pp foi observado nas doses 500 e 1000mg/kg comparadas ao veículo. Essa elevação não parece ser devido a toxicidade do EtOH-Pp com comprometimento hepático, pois as enzimas AST e ALT não sofreram alterações significativas, mas pode estar relacionada a distúrbios no metabolismo do músculo esquelético segundo Amida et al., (2007) ou alteração óssea (OLUDURO; ADERIYE, 2009).

Nas concentrações séricas de uréia e creatinina não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, porém seus valores foram menores que os de referência, fato que confirma a não toxicidade do EtOH-Pp aos rins.

4.2.3 Aspectos macroscópicos dos órgãos

A análise macroscópica do coração, cérebro, hipófise, adrenais, fígado, rins, baço, ovários e útero não demonstrou alteração em sua cor e morfologia, fato que evidencia a incapacidade do extrato de produzir alterações estruturais, perceptíveis visualmente, nesses órgãos.

4.2.4 Massa absoluta e relativa dos órgãos

Foram analisadas as massas absolutas e relativas dos órgãos internos e, dada a uniformidade da massa corporal dos animais, foram observadas as mesmas significâncias estatísticas tanto para as massas absolutas quanto para as relativas, por isso apresentamos apenas a massa relativa à massa cerebral (TABELA 5). A hipófise, adrenais, fígado, rins, baço, coração, ovários e cérebro não demonstraram diferenças significativas nas médias de suas massas relativas ao cérebro, entre os grupos tratados com o EtOH-Pp e veículo.

Com relação ao útero, houve redução significativa da sua massa relativa nas doses 250, 500 e 1000mg/kg e o veículo, enquanto entre as doses não foram observadas diferenças significativas. Segundo Wolfsegger et al., (2009) a alteração de peso pode indicar efeito tóxico direto de um extrato sobre um órgão até mesmo na ausência de mudanças morfológicas no órgão. Dessa forma o EtOH-Pp apresenta indícios de toxicidade direta sobre o útero.

TABELA 5 - Massa dos órgãos das ratas em relação ao cérebro (g) após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) nas diferentes doses

Órgão	Massas dos órgãos em relação ao cérebro (g)			
	Tratamento			
	Veículo (H ₂ O d)	EtOH-Pp 250mg/kg	EtOH-Pp 500mg/kg	EtOH-Pp 1000mg/kg
Hipófise	0,006 ± 0,0007	0,006 ± 0,001	0,013 ± 0,008	0,006 ± 0,0006
Adrenais	0,019 ± 0,002	0,016 ± 0,002	0,016 ± 0,002	0,018 ± 0,0009
Fígado	2,846 ± 0,107	2,698 ± 0,011	2,741 ± 0,096	2,750 ± 0,076
Rins	0,346 ± 0,008	0,353 ± 0,007	0,347 ± 0,010	0,336 ± 0,009
Baço	0,325 ± 0,021	0,332 ± 0,016	0,331 ± 0,010	0,323 ± 0,015
Coração	0,380 ± 0,008	0,403 ± 0,021	0,365 ± 0,007	0,357 ± 0,011
Útero	0,492 ± 0,057	0,229 ± 0,009 ^a	0,253 ± 0,024 ^a	0,287 ± 0,025 ^a
Ovários	0,028 ± 0,020	0,026 ± 0,002	0,055 ± 0,029	0,034 ± 0,003

Os dados representam a média ± erro padrão da média dos animais, n = 8. Útero: (^a p < 0,05 vs. veículo).

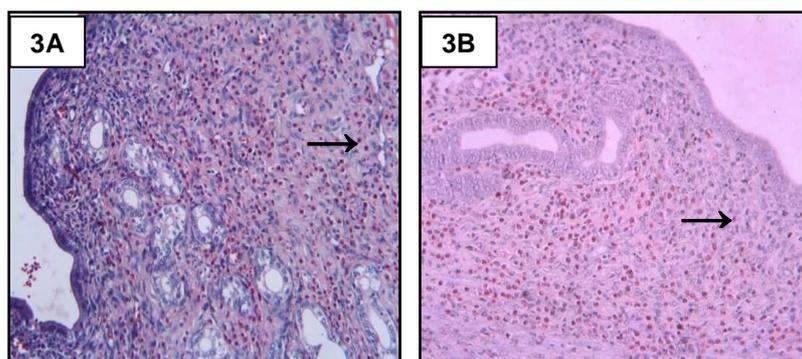
O fato da redução de massa uterina se repetir tanto nas medidas absolutas quanto relativas ao cérebro corrobora também a possibilidade de efeito tóxico do EtOH-Pp, especialmente porque conforme relata Bailey et al., (2004) a massa do cérebro usualmente não sofre influência de substâncias químicas

Outro mecanismo possível que explicaria a diminuição da massa uterina seria a presença de substâncias com atividade antiestrogênica no EtOH-Pp, que reduziria o efeito dos estrógenos endógenos, conforme estudo sobre os efeitos da espécie *Nelumbo nucifera* em órgãos reprodutivos desenvolvido por Mutreja et al., (2008), neutralizando seus efeitos proliferativos sobre o útero. Essas substâncias podem ser flavonóides, compostos possivelmente presentes no EtOH-Pp em estudo prévio (Bezerra, 2009), que podem apresentar ação anti-estrogênica por mecanismo independente e dependente de receptor de estrógeno (COLLINS-BUROW et al., 2000).

4.2.5 Análise histopatológica

Quanto á análise histopatológica, coração, cérebro, fígado, rins e ovários não demonstraram alterações significativas nos grupos tratados com extrato em relação ao veículo. No útero, verificou-se presença de infiltrado polimorfonuclear com predomínio de eosinófilos tanto nos grupos tratados com extrato como no veículo (FIGURA 3), achado normal, interpretado erroneamente por muitos autores como anormal segundo Percy; Barthold, (2001).

FIGURA 3 - Fotomicrografia do útero após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) - 3A e 3B - infiltrado polimorfonuclear de eosinófilos no grupo veículo e dose 500mg/kg (→), HE 20X



4.3 Toxicidade reprodutiva no estágio de implantação embrionária

Os resultados do efeito do EtOH-Pp (TABELA 6) mostram aumento do número de corpos lúteos na dose 250mg/kg, em relação ao veículo indicando aumento da taxa de ovulação nesse grupo, efeito esse que não é dependente da dose, pois torna-se insignificante nas doses maiores. Adicionalmente, na maior dose (1000mg/kg), foi também observado aumento significativo do número de implantações, o que configura um efeito favorável à fertilidade das fêmeas. Por outro lado, o número de reabsorções e do índice de perdas pós-implante também aumentaram na maior dose, representando indício de efeito antifertilidade.

Os aumentos observados no número de reabsorções, índice de reabsorção e perda pós-implante na dose de 1000mg/kg em relação ao veículo constituem, portanto, evidências de que o extrato EtOH-Pp pode provocar efeito

tóxico para o desenvolvimento do embrião. Em pesquisa sobre o potencial abortivo do extrato de folhas da espécie *Bambusa vulgaris* em coelhas Dutch prenhas Yakubu; Buboye, (2009) observaram morte pós-implantação. Tal efeito pode ser justificado por possível presença de flavonóides já encontrados em extratos etanólicos das folhas de *Parkia platycephala* Benth por Bezerra, (2009) como também de esteróides demonstrados no gênero *Parkia* conforme relata Ajaiyeoba, (2002), e que são relatados como responsáveis por efeitos abortivos (YAKUBU et al., 2010).

TABELA 6 - Toxicidade reprodutiva no estágio de implantação quanto ao número de corpos lúteos, implantações, reabsorções e índices de implantações, reabsorções, perdas pré-implante e pós-implante após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) nas diferentes doses

Parâmetro	Toxicidade reprodutiva no estágio de implantação embrionária			
	Tratamento			
	Veículo (H ₂ Od)	EtOH-Pp 250mg/kg	EtOH-Pp 500mg/kg	EtOH-Pp 1000mg/kg
(Número)				
Corpo lúteos	9,625 ± 0,596	13,250 ± 1,221 ^a	11,875 ± 0,441	12,000 ± 0,732
Implantações	8,375 ± 0,532	10,375 ± 0,625	10,250 ± 0,366	11,500 ± 0,886 ^a
Reabsorções	0,250 ± 0,164	0,750 ± 0,366	0,125 ± 0,125	1,753 ± 0,590 ^a
(Índice)				
Implantação	85,769 ± 6,654	81,321 ± 5,919	75,457 ± 9,633	95,735 ± 3,382
Reabsorção	2,639 ± 1,731	7,419 ± 4,007	1,563 ± 1,563	34,591 ± 12,630 ^a
PPRI	10,480 ± 7,221	21,426 ± 5,984	13,285 ± 2,991	7,593 ± 2,405
PPSI	6,209 ± 3,613	12,058 ± 5,455	3,889 ± 2,681	34,679 ± 12,614 ^a

Os dados representam a média ± erro padrão da média dos animais, n = 8. Números de corpos lúteos, implantações, reabsorções, índices de reabsorção e PPSI: (^a p < 0,05 vs. veículo). PPRI (perda pré-implante); PPSI (perda pós-implante).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o veículo em relação aos índices de implantação e de perda pré-implante o que indica que o extrato em estudo não apresenta efeito tóxico sobre o desenvolvimento embrionário antes da implantação, que possa provocar a perda do embrião

conforme observaram Maganha et al., (2006) em pesquisa sobre influência do lapachol no estágio de implantação do desenvolvimento embrionário de ratos.

4.4 Toxicidade reprodutiva no estágio de organogênese

Os resultados da toxicidade reprodutiva no estágio organogênese do EtOH-Pp quanto ao número de placentas, fetos, fetos vivos, mortos e malformados, massa da placenta, fetos e ninhada estão dispostos na TABELA 7. Durante o estágio de organogênese não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo veículo.

TABELA 7 - Toxicidade reprodutiva no estágio de organogênese quanto ao número de placenta, fetos, fetos vivos, mortos e malformados, massa da placenta, fetos e ninhada (g) após 30 dias de administrações do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth (EtOH-Pp) nas diferentes doses

Parâmetro	Toxicidade reprodutiva no estágio de organogênese			
	Tratamento			
	Veículo (H ₂ O d)	EtOH-Pp 250mg/kg	EtOH-Pp 500mg/kg	EtOH-Pp 1000mg/kg
(Número)				
Placenta	8,125 ± 0,479	10,000 ± 0,707	10,125 ± 0,441	9,750 ± 0,726
Fetos	8,500 ± 0,681	9,500 ± 0,779	9,250 ± 1,114	9,750 ± 0,726
Fetos vivos	7,875 ± 0,611	9,250 ± 0,921	9,875 ± 0,515	9,750 ± 0,726
Fetos mortos	0,250 ± 0,250	0,250 ± 0,164	0,250 ± 0,250	0,000 ± 0,000
Fetos malformados	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,125 ± 0,125	0,000 ± 0,000
(Massa (g))				
Placenta	0,628 ± 0,029	0,597 ± 0,041	0,510 ± 0,019	0,554 ± 0,030
Fetos	3,191 ± 0,453	2,758 ± 0,272	2,710 ± 0,287	3,054 ± 0,411
Ninhada	25,488 ± 3,260	25,488 ± 3,260	26,371 ± 3,803	27,248 ± 2,780

Os dados representam a média ± erro padrão da média dos animais, n = 8.

Apesar de ter sido registrado perdas significantes pós-implante não foi observado a presença significativa de natimortos, que indica que o EtOH-Pp administrado durante todo o período de organogênese pode ter causado mortalidade

muito antes da gestação chegar a término, no início da fase fetal, de modo que os fetos foram reabsorvidos e não estavam presentes em suas respectivas placentas. As perdas pós-implante não resultaram em diminuição do tamanho da ninhada, provavelmente devido ao aumento da taxa de ovulação e do número de implantações, que pode ter compensado as perdas.

Não foi possível estabelecer precisamente a maior dose que não demonstra toxicidade (NOAEL), porque apareceram sinais de toxicidade desde a menor (250mg/kg) até a maior dose (1000mg/kg), deduz-se então que, possivelmente esta seja inferior a 250 mg/1000g. Não foi possível determinar também a menor dose que causa efeito tóxico mas não leva à morte (LOAEL), mas também sabe-se que pode ser 250 mg/1000g ou inferior a esta. No entanto, a toxicidade na menor dose se restringiu a uma redução no consumo de água e alterações reprodutivas, com aumento da taxa de ovulação e redução do peso uterino. Novos experimentos necessitam ser realizados, partindo de doses menores, para que se possam estabelecer esses limites.

Em síntese, o EtOH-Pp induziu alterações significantes na frequência das fases do ciclo estral de ratas, com redução de proestros e aumento de diestros, diminuição da ingestão de água e ração e da massa corpórea. Não provocou alterações macroscópicas nos órgãos internos examinados e quanto á massa desses órgãos, somente o útero teve sua massa reduzida significadamente, possivelmente devido ao predomínio da fase progesterônica diéstrica e ou da presença de substâncias antiestrogênicas no extrato. Nas dosagens bioquímicas séricas não foram observadas alterações indicativas de disfunções hepáticas e renais, apenas aumento significativo de fosfatase alcalina, que pode ser indício de alteração muscular ou óssea. Quanto à toxicidade gestacional o extrato provocou aumento de corpos lúteos, e portanto de ovulações, não alterou os índices pré-implante, porém aumentou os índices de perdas pós-implante, sem aparecimento significativo de natimortos por ocasião da cesariana, indicando morte no início da fase fetal. A maior dose que não causa efeito tóxico (NOAEL), assim como a menor dose tóxica que não causa a morte (LOAEL) deve está abaixo de 250 mg/kg.

5 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o presente experimento podemos concluir que o EtOH-Pp:

1. Aumenta o índice da fase diéstrica;
2. Reduz consumo de água e ração;
3. Aumenta concentrações de fosfatase alcalina sérica;
4. Reduz massa corpórea, massa absoluta e relativa do útero;
5. Aumenta os índices de reabsorção e perdas pós-implante em ratas gestantes.

6 PERSPECTIVAS

1. Verificar a reversibilidade dos efeitos do extrato EtOH-Pp sobre o ciclo estral;
2. Observar a possibilidade de efeitos contraceptivos;
3. Determinar os possíveis mecanismos de toxicidade quanto aos parâmetros de consumo de água, ração e massa corpórea;
4. Determinar os possíveis mecanismos de toxicidade sobre o útero;
5. Analisar possível ação estrogênica e antiestrogênica do extrato EtOH- Pp;
6. Estabelecer doses NOAEL e LOAEL.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEBAIO, J.O. et al. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rats kidney. **Journal Ethnopharmacology**, n. 88, p. 69-72, 2003.
- AGUNU, A. et al. Evaluation of five medicinal plants used in diarrhoea treatment in Nigeria. **Journal Ethnopharmacology**, v. 101, n. 3, p. 27-30, 2005.
- AKINTAYO, E. T. Characteristics and composition of *Parkia biglobosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. **Bioresource Technology**, v. 92, n.3, p.307-310, 2004.
- AJAIYEGBA, E. O. Phytochemical and antibacterial properties of *Parkia biglobosa* and *Parkia bicolor* of leaf extracts. **African Journal of Biomedical Research**, v. 5, n.3 p.125-129, 2002.
- AMACHER, D. E. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. **Human & Experimental Toxicology**, n. 21, p. 253-262, 2002.
- AMARAL, D. A.; BARCIA, S. A. Intoxicações por medicamentos. In: OGA, S. (org.). **Fundamentos de Toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 369-379.
- AMEH, S. J. et al. Current phytotherapy - A perspective on the science and regulation of herbal medicinal. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 72-81, 2010.
- AMIDA, M. B.; YEMITAN, O. K.; ADEYEMI, O. O. Toxicological assement of the aqueous root extract of *Sansevieria liberica* Gerome and Labory (Agavaceae). **Journal Ethnopharmacology**, n.113, p. 171-175, 2007.
- AMORIM, V. R. **Avaliação dos efeitos de *Parkia platycephala* Benth no diabetes mellitus experimental**. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia com ênfase em Plantas Medicinais) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.
- ASUZU, I. U.; HARVEY, A. L. The antisnake venom activities of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) stem bark extract. **Toxicon**, v. 42, p. 763-768, 2003.
- 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**, n. 38, p.448-466, 2004.
- BAKRY, S. et al. Effect of depo-provera on estrous cyclicity, serum proteins and lipid profile in mice. **World Applied Sciences Journal**, v. 8, n.9, p. 1042-1049, 2010.
- BARROS, L. A. **Avaliação da atividade e toxicidade reprodutiva do extrato hidroalcoólico das folhas *Azadiractha indica* em ratos Wistar machos e fêmeas**. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia com ênfase em Plantas Medicinais) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

BEZERRA, R. D. S.; CARVALHO, A. A.; CHAVES, M. H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Parkia platycephala* BENTH.** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T0803-1.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2011.

BEZERRA, R. D. **Extração, purificação e caracterização dos constituintes químicos e avaliação da atividade antioxidante de *Parkia platycephala* Benth.** 2009. 26f. Relatório final apresentado ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

BORTOLETTO, M. E. et al. Análise epidemiológica dos casos de intoxicação humana no Brasil no período de 1985-1993. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.9, n.2, p.1-12, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 116/96, de 08 de agosto de 1996. Normas para estudos toxicológicos e da eficácia de produtos fitoterápicos. Brasília: Diário oficial [da] Republica Federativa do Brasil, poder Executivo, Brasília, DF, 12 ago. 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48/2004, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília: Diário oficial [da] Republica Federativa do Brasil, poder Executivo, Brasília, DF, v. 53, 18 mar. 2004a. Seção 1, p.39-41.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 90/2004, de 16 de março de 2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Brasília: Diário oficial [da] Republica Federativa do Brasil, poder Executivo, Brasília, DF, v. 53, 18 mar. 2004b. Seção 1, p.34-35.

BRASIL. Presidência da República. Decreto Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006. **Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/civil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5843.htm>. Acesso em: 14 nov. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008. **Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Disponível em: <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri2960_09_12_2008.html>. Acesso em: 14 nov. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - RENISUS**, fevereiro 2009. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS_2010.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2011.

BUCKLEY, L. A.; DORATO, M. A. High dose selection in general toxicities studies for drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Regulatory and Toxicology and Pharmacology**, n. 54, p. 301-307, 2009.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMPELLO, C. C. et al. Desempenho e parâmetros séricos de ratos alimentados com dietas contendo soja integral crua. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 188-198, 2009.

CAMPBELL, M. A. et al. Reduced water intake: implications for rodents developmental and reproductive toxicity studies. **Birth Defects Research (Parte B)**, n. 86, p. 157-175, 2009.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Toxicological evaluation of an ethylacetato extrato *Anthelmia* Linn in rats and mice. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.11, n.3, p. 152-162, set/dez. 2004.

CARSON, D. D. et al. Embryo implantation. **Developmental Biology**, n. 223, p. 217-237, 2000.

CAVADA, B. S.; MORENO, F. B. A. M.; AZEVEDO, J. R. W. F. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL, endochitinase and – acetylglucosamine binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **Febs Journal**, v. 273, p. 3962-3974, 2006.

CHAUDHRI, O.; SMALL, C.; BLOOM, S. Gastrintestinal hormones regulating appetite. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, n. 361I, p. 1187-1209, 2006.

COLLINS-BUROW, B. M. et al. Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding-dependent and independent mechanism. **Nutrition Cancer**, v.38, n. 2, p.229-244, 2000.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 3, 1952. p. 28.

CULLEN, J. M.; MILLER, R. T. The role of in the identification of drug-induced hepatic toxicity. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, n.2, p. 241-247, 2006.

CUMMINGS, A.M. Toxicological mechanisms of implantation failure. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 571-579, 1990.

DEL SOL, F. G. et al. Energetics of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -mannose binding to the *Parkia Platycephala* seed lectin and its use for MAD phasing. **Structural Biology and Crystallization Communications: Acta Crystallographica Section F**, v. 61, n. 3, p. 326–331, 2005.

FAVACHO, A. R. M.; CINTRA, E. A.; COELHO, LINHARES. C. B. B. In vitro activity evaluation of *Parkia pendula* seed lectin against human cytomegalovirus and herpes virus 6. **Biologicals**, v. 35, n.3, p. 189-194, 2007.

FERNANDES, H. B. **Investigação da atividade gastroprotetora do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth. e da fração hidroalcoólica extraídas das folhas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var. *acuminata* Teles Freire (LEGUMINOSEAE) em roedores.** 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia com ênfase em Plantas Mediciniais) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

FOGLIO, M. A et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais**, n. 7, p. 1-8, out. 2006. Disponível: < http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2011.

FONSECA, M. L. et al. **Outros constituintes químicos isolados das folhas de *P. pendula* (Leguminosae).** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T0305-2.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2010.

FURUKAWA, S. et al. Toxicological pathology in the rat placenta. **Journal of Toxicologic Pathology**, n. 24, p. 95-111, 2011.

GEORGE, P. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants – An overview. **Journal Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n.6, p. 40-44, 2011.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. The rodents estrus cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research (parte B)**, n.80, p. 84-97, 2007.

HAGE, S. et al. In vitro screening on β -amyloid peptide production of plants used in traditional medicine for disorders cognitive, **Journal Ethnopharmacology**, v.131, p. 585-591, 2010.

HAQ, I. Safety of plants medicinal. **Pakistan Journal of Medical Research**, v. 43, n.4, p. 1-8, 2004. Disponível em: < <http://www.pmrc.org.pk/434/43413.pdf> >. Acesso em: 29 ago. 2011.

HOPKINS, H. C. F. *Parkia* (Leguminosae: Mimosoideae). In: HOPKINS, H. C. F. **Flora Neotrópica**. New York: The New York Botanical Garden, 1986. p.44..

HOLLENBACH, C. B. **Estudo da toxicidade reprodutiva de duas formulações fitoterápicas contendo soja [*Glicine max* (L.) Merr] em ratos Wistar.** 2008. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Toxicologia) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

IWUANYANWU, K. C.; WEGWU, M. O.; OKIYI, J. K. Effects hepatoprotective of African Locust Bean (*Parkia clappertoniana*) and Negro Pepper (*Xylopi a aeothiopica*) in CCl₄-induced liver damage in Wistar albino rats. **International Journal of Pharmacology**, v.6, n.5, p. 744-749, 2010.

- KENNEDY, T. K. **Physiology of implantation**. In: CONGRESSO IN VITRO FERTILIZATION AND ASSISTED REPRODUCTION, 29., 1997, Canadá. Disponível em: <<http://publish.uwo.ca/~kennedyt/t108.pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2011.
- KODJO, K. M. et al. In vitro effects of crude extracts of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae), *Stereospermum kunthianum* (Bignoniaceae) and *Biophytum petersianum* (Oxalidaceae) on corticosteroid secretion in rat. **Journal of Steroid Biochemical and Molecular Biology**, v. 100, p.202-208, 2006.
- KOUADIO, F. et al. Analgesic and antiinflammatory activities of an extract from *Parkia biglobosa* used in traditional medicine in the Ivory Coast. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 635-637, 2000.
- LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia dos produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre: editora da UFRGs, 2000. p.181-196.
- LARINI L. Avaliação toxicologica. In: LARINI, L. **Toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1993. p. 43-58.
- LEE, W. M. Acute liver failure in the United States. **Seminars in Liver Disease**, n.23, p.217-226, 2003.
- LEWIS, G. et al. **Legumes of the world**. Kew, Royal Botanic Gardens, n. 28, p. 577, 2005.
- LIMA, H. C.; FORTUNATO, R. H. **Avances en Fabáceas: introducción**. In: **Congresso Latinoamericano de Botânica**, v. 6, Mar del Plata. 1998. **Proceedings of the VI Congresso Latinoamericano de Botânica**. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, p.101-102, 1994.
- LIMA, H. C. **Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. 2000. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000, p. 141.
- LOPES, F. C.; CAVADA, B. S.; PINTO, V. P. T.; SAMPAIO, A. H.; GOMES, J. C. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 935, 2005.
- LORTLAR, N.; KILIC, S.; PEKER, T. The long-term effects of progesterone-only contraceptives on endometrium and ovary in rats. *Arch. Gynecol. Obstet.*, n 19, jan. 2010.
- MAGANHA, J. et al. Embryo development alteration in rats treated with lapachol. Brazilian archives of biology and technology. **International Journal**, v. 49, n.6, p. 927-934, 2006.

MARIZ, S. R. **Estudo toxicológico pré-clínico de *Jatropha gossypifolia* L.** 2007.186f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

MELLO F. B. **Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos.** 2001.120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

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

MEYER, D.; HARVEY, J. W. Hepatobiliary and skeletal muscle enzymes and liver functions tests. In: MEYER, D.; HARVEY, J.W. (Eds). **Veterinary laboratory medicines: interpretation and diagnosis.** WB. Saunders Co, St Louis, MO, p. 169-192, 2004.

MILLER, K. P. et al. In utero effects of chemicals on reproductive tissues females. **Toxicology and Applied Pharmacology**, n. 198, p.111-131, 2004.

MOUSA, M. A. et al. Histological changes at the sites of embryo implantation in albino rats. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v. 32, p.339-351, 2008.

MUKINDA, J. T.; SYCE, J. A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **Journal Ethnopharmacology**, n.112, p.138-144, 2007.

MUTREJA, A. et al. Effect of *Nelumbo nucifera* seeds on the reproductive organs of female rats. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 6, n.1, p.7-11, 2008.

MÜLLER, J. B. **Abordagem farmacológica da *Copaifera luetzelburgii*, harms com ênfase em toxicologia reprodutiva: estudo *in vivo* e *in vitro*.** 2011. 83f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia com ênfase em Plantas Medicinais) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

NEPOMUCENO, F. et al. Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com *Hypericum perforatum* durante o período de implantação. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.3, p.224-228, 2005.

NWAOGU, L. A.; UDEBUANI, A. C. Effect on the nutritional and toxicological components of *Cleome rutidosperma* seed. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n.2, 2010.

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT). Guideline for the testing of chemicals – nº 407: “**Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents**” (adopted by the Council: 27th July 1995), p. 1-8, 1995. Disponível:< <http://www.oecd.org/dataoecd/17/52/1948386.pdf> >. Acesso em: 01 dez. 2010.

- ODETOLA, A. A. et al. Possible antidiabetic antihyperlipidemic effect of fermented *Parkia biglobosa* (jacq) extract in alloxan-induced diabetic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 9, p. 808-812, 2006.
- OLUDURO, A. O.; ADERIYE, B. Effect of *Moringa oleifera* seed extract on vital organs and tecidos enzymes activities of male albino rats. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 9, p.537-540, 2009.
- OSADEBE, P.; O.; OMEJE, E., O. Comparative acute toxicities and immunomodulatory and potentials of five Eastern Nigeria mistletoes. **Journal Ethnopharmacology**, v. 126, p.287-293, 2009.
- PARK, M-Y. et al. 28 days repetead oral dose toxicity tests of aqueous extracts of mahawangyounpae-tang, a polyherbal formula. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p.2477-2482, 2010.
- PANDEY, M. et al. Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential source of therapeuthics. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v.3, n. 3, p.27-37, 2011.
- PERCY, D. H.; BARTHOLD, S. W. Pathology of laboratory rodents & rabbits. 2^a ed. U.S.A: Iowa State University Press, 2001. 315p.
- POURMORAD, F.; HOSSEINIMEHR, S. J.; SHAHABIMAJD, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 11, p.1142-1145, 2006.
- QUIRISH, Y.; YAMIB, A.; ZARGAR, M. A.; SINGH.; S. K.; SAXENA, A. K. Potential role of natural molecules in health and disease: Importance acid boswellic. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 25, p.2778-2885, 2010.
- RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameter. **Food and Chemical Toxicology**, n. 45, p. 1551-1557, 2007.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, 603-613, 2001.
- RENDU, F.; SALEUN, S.; AUGER, J. *Parkia biglobosa* seeds posses anti platelet activity. **Thrombosis Research**, v. 71, p. 505-508, 1993.
- REUTER, U. et al. Evaluation of OECD screening tests 421 (reproduction /developmental toxicity screening test) and 422 (combined repeated dose toxicity study with the reproduc tion/developmental toxicity screening test). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, n.38, p.17-26, 2003.
- SANDHAR, H. K. et al P. A rewiew of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. **International Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 25-41, 2011. Disponivel em: < <http://www.ipharmaceutica.com>> . Acesso em: set. 2011.

SANTOS, D. B. **Estudos dos efeitos do extrato etanólico das folhas da *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. acuminata Teles Freire sobre parâmetros reprodutivos e histopatológicos em ratas.** 2009. 45f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia com ênfase em Plantas Medicinais) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

SALMAN, S. et al. Contraceptive effects of *Onosma armeniacum* on embryo implantation in rats. **Cell membranes and free radical research**, v. 1, n. 3, p.90-94, 2009.

SHIVALINGAPPA, H. et al. Effect of extract of *Rivea hipocreteriformis* on the estrous cycle of the rat. **Journal Ethnopharmacology**, n. 82, p. 11-17, 2002.

SINITOX (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS). **Casos, óbitos e letalidade de intoxicação humana por agente e por região. Brasil, 1999-2009.** Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em: 27 jul. 2011.

SOETAN, K. O.; AYIELAAGBE, O. O. The need for bioactivity-safety evaluation and conservation of medicinal plants – A review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n.5, p.324-428, 2009.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.3, p.435-440, 2010.

SOLTER, P. F. Clinical approaches to hepatic injury. **Toxicologic Pathology**, n.33. p. 9-16, 2005.

SUZUKI, K.; SIMPSON, K. A.; MINNION, J. S.; SHILLITO, J. C.; BLOOM, S. R. The role of gut hormones and hypothalamus in appetite regulation. **Endocrine Journal**, n. 57, v. 5, p. 359-372, 2010.

TRINGALI, C.; SPATAFORA, C.; LONGO, O. D. Bioactive constituents of the bark *Parkia biglobosa*. **Fitoterapia**, n. 71, p.118-125, 2000.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, n. 42, p. 189-306, 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 de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

YAKUBU, M. T.; BUKOYE, B. B. Abortifacient potentials of the extracts of *Bambusa vulgaris* leaves in pregnant Dutch rabbits. **Contraception**, n. 80, p. 308-313, 2009.

YAKUBU, M. T. et al. Abortifacient potential of aqueous extract of *Senna Alata* leaves in rats. **Journal of Reproduction and Contraception**, v. 21, n.3, p. 163-177, 2010.

ZUCHER, S. D. et al. Mechanism of indanivir-induced hyperbilirubinemia, **PNAS** **98**, p. 12671-12677, 2001.

WATTS, A. G.; BOYLE, C. N. The functional architecture of dehydration-anorexia. **Physiology & Behavior**, v.100, n.5, p.472-477, 2010.

WOLFSEGGER, M. J.; JAKI, T.; DIETRICH, B.; KUNZLER, J. A.; BARKER, K. A none statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, n. 240, p.117-122, 2009.

WEINBAUER, G. F. et al. Physiology and endocrinology of the ovarian cycle in macaques. **Toxicologic Pathology**, n. 36, p. 1-33, 2008.