

MARCOS DANIEL DE SOUSA FERREIRA

**TOXICIDADE SISTÊMICA E REPRODUTIVA DO FRUTO DE
Buchenavia sp. EM ROEDORES**

TERESINA - PI

2016

MARCOS DANIEL DE SOUSA FERREIRA

**TOXICIDADE SISTÊMICA E REPRODUTIVA DO FRUTO DE *Buchenavia sp.* EM
ROEDORES**

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

Área de concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^a Dra. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva

TERESINA - PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

F383t Ferreira, Marcos Daniel de Sousa

Toxicidade sistêmica e reprodutiva do fruto de *Buchenavia*
sp. em roedores / Marcos Daniel de Sousa Ferreira.- 2016.
82f. il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal
do Piauí, Teresina, 2016.

Orientação: Prof^a. Dr.^a Silvana Maria Medeiros de Sousa
Silva

1.Planta tóxica 2.*Buchenavia* sp. 3.Machos 4.Fêmeas
5.Fertilidade I.Título

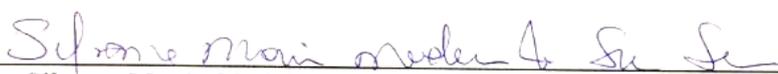
CDD: 615.952

**TOXICIDADE SISTÊMICA E REPRODUTIVA DO FRUTO DE *Buchenavia sp.*
EM ROEDORES**

MARCOS DANIEL DE SOUSA FERREIRA

Tese aprovada em: 30/06/2016

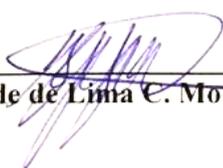
Banca Examinadora:



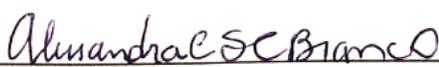
Profa. Dra. Silvana Maria Medeiros de Sousa e Silva (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Janylla Mirek Guerra de Oliveira (Interna) / CPCE/UFPI



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



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



Prof. Dr. Paulo Alex Bezerra Sales (Externo) / Nenhuma

DEDICATÓRIA

*A Deus, meu criador e Salvador.
Seu fôlego de vida em
mim me foi sustento e me deu coragem para questionar
realidades e propor sempre um novo mundo de
possibilidades.*

AGRADECIMENTOS

À DEUS, único digno de toda honra, glória e louvor;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Silvana Maria de Sousa Silva por orientação;

Aos meus pais, Helédia de Souza Ferreira e Jean Gomes Ferreira, por sempre me apoiarem e pelo amor demonstrado;

À minha tia Helenídia de Souza Cardoso, por estar sempre contribuindo com minha educação, desde o colégio até os dias de hoje;

Ao meu avô paterno, Gentil G. Ferreira pelos conselhos e ensinamentos;

À Minha avó paterna, Helena S. Ferreira (*in memorian*) por seu carinho, cuidados e ensinamentos;

À Minha avó materna Lídia Bezerra de Souza (*in memorian*), por todo o amor dedicado a mim durante a sua vida; sinto muito a sua falta e fico triste por não estar aqui presente pra que a diga o quanto é especial pra mim... mesmo sabendo que palavra alguma pode expressar todo o meu amor por você;

À minha irmã Lia Raquel, por me ajudar sempre;

Ao meu irmão Jean Júnior e sua esposa Michelle Rayane, por estarem sempre presentes;

A Isabella “do titio”, pelas tardes “assistindo galinha pintadinha e patati-patatá”, pelas madrugadas sem dormir assistindo “Backyardigans”, por seu “abração” e suas demonstrações verdadeiras de afeto;

Aos demais familiares, que mesmo distantes torceram por mim;

À Emanuelle Karine Frota Batista, pela sua contribuição laboratorial, e por sua disposição em ajudar sempre;

Aos colaboradores: Ingrid dos Santos Farias, Lildes Ferreira Santos e a Dr.^a Silvéria Regina de Sousa Lira, pelas contribuições para a execução desse trabalho;

Aos amigos Lidiany Viana Pires, Andréia da Silva Costa, Catarina Rafaela Alves da Silva, Daniela Cristina Pereira Lima, Deyse Naira Mascarenhas Costa, Francisco das Chagas Cardoso Filho e Thays Carvalho de Sá Maia, pela amizade desde a graduação, pelo imenso apoio prestado nos momentos difíceis e por sempre estarem dispostos a ajudar;

Aos amigos Daluz Lima, Eric Bezerra, Jardeany, Gaby, Carol, Rapha, Pedro, Júnior, Zilma, Taynara, Gabryelle Maria, Isabel Cristina, Magnólia Pereira, Clara Braz, Nallia Cruz, Socorro Cruz e Raimundo Cruz e Francisco Sávio por torcerem por mim e pelas palavras de incentivo e afeto;

A Prof^a Dr.^a Maria do Carmo de Souza Batista por sua amizade e por ser um grande exemplo ético e profissional; admiro a sua força e determinação para fazer sempre o melhor, bem como, por seus ensinamentos e contribuição científica;

Ao Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa e Prof. Dr. Gregório Elias Nunes Viana, pelos ensinamentos e suporte no Laboratório de Ciências Fisiológicas;

A Prof^a Dr.^a Mariana Helena Chaves, por ceder seu laboratório e pela contribuição;

Aos Prof. Dr. Rozeverter Moreno Fernandes e Maria Zenaide de Lima Chagas Moreno Fernandes, por terem me iniciado no meio científico;

Aos professores e funcionários da Pós Graduação em Ciência Animal da UFPI;

Aos funcionários do Setor de Patologia Animal pela grande ajuda prestada;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

À Universidade Federal do Piauí pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação e propiciar o ambiente para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos os animais que fizeram parte deste trabalho pela inestimável contribuição.

E a todos que colaboraram diretamente e indiretamente para a conclusão desta pesquisa com sugestões e críticas;

Obrigado!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO.	xii
ABSTRACT.	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Objetivos.....	15
1.1.1 Geral.	15
1.1.2 Específicos.....	15
1.2 Estruturação da Tese.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.	17
2.1 A pecuária piauiense e as plantas tóxicas.....	17
2.2 Toxicidade reprodutiva causada por plantas.	18
2.3 A família <i>Combretaceae</i>	20
2.3.1 O gênero <i>Buchenavia</i>	20
2.4 Testes utilizados na avaliação da toxicidade de plantas em animais.....	23
3 CAPÍTULO I - Análise fitoquímica e toxicológica dos extratos do fruto de <i>Buchenavia sp.</i> (Combretaceae)	26
4 CAPÍTULO II - Avaliação do potencial tóxico reprodutivo do extrato etanólico do fruto de <i>Buchenavia sp.</i> em ratos Wistar	50
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
6 REFERÊNCIAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AST	Alanina aminotrasferase
ALT	Aspartato aminotrasferase
ANOVA	Análise de Variância
BIOMADEx	Biotério de manutenção de animais destinados a experimentação
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CE ₅₀	Concentração efetiva média
DL ₅₀	Dose letal média
DPM	Desvio Padrão da Média
EEtOH-B	Extrato etanólico das cascas de <i>Buchenavia</i> sp
EPM	Erro padrão da média
FDA	Food and Drug Administration
FLAT	Flavonóides Totais
FT	Fenóis Totais
g	Gramas
H ₂ O _d	Água destilada
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
i.p.	Intra-peritoneal
IN%	Índice de nascimento
IP%	Índice de parto
IV%	Índice de viabilidade
Kg	Quilograma
LDL-c	Colesterol de densidade baixa
µg	Micrograma
µM	Micrômetro
ml	Mililitros
min	Minutos
OECD	Organização Econômica de Cooperação e Desenvolvimento
PPGCA	Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPI	Universidade Federal do Piauí
v.o.	Via oral
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1- *Buchenavia sp.* Fonte: MELLO et al., (2010). 22

CAPÍTULO I

Figura 1- A - Artemeira mantida sob aeração e controle de luz; B- náuplios eclodidos de *Artemia salina*; C- Tubos de Ensaio Extrato etanólico de *Buchenavia sp.* em diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000 µg/mL) e controle com as larvas de *Artemia salina* 31

CAPÍTULO II

Figura 1 - Evolução ponderal de ratas expostas ao tratamento com EEtOH-B (250, 500, 1000 mg/kg, v.o.) e controle (H₂O, v.o.), 16 dias antes do tratamento, 16 dias em tratamento e 16 dias pós-tratamento. Os dados expressam média em gramas. n=8. 65

Figura 2 - A: Fígado de rata submetida ao tratamento com extrato etanólico do fruto de *Buchenavia sp* (1000mg/kg) sem alterações macroscópicas ; B: Tecido hepático sem alterações microscópicas. 20x..... 66

Figura 3 – A: Rim direito e esquerdo de rata submetida ao tratamento com extrato etanólico do fruto de *Buchenavia sp* (1000mg/kg) sem alterações macroscópicas; B: Tecido renal sem alterações microscópicas. 20x..... 67

Figura 4 - A: Útero de rata submetida ao tratamento com extrato etanólico do fruto de *Buchenavia sp* (250mg/kg) aumentado de volume tendo como conteúdo muco - Mucometra. B: Dilatação das glândulas da mucosa uterina 20x..... 68

Figura 5 - Útero de rata submetida ao tratamento com extrato etanólico do fruto de *Buchenavia sp* (250mg/kg) com seu antímero esquerdo contendo fetos e no direito muco..... 67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Resultados da abordagem fitoquímica do extrato etanólico do fruto de <i>Buchenavia</i> sp. e suas frações.....	34
Tabela 2 - Mortalidade média de <i>Artemia salina</i> de acordo com as concentrações do extrato etanólico de <i>Buchenavia</i> sp.	38
Tabela 3 - Massa dos órgãos de ratos tratados com as frações acetato de etila e aquosa do extrato etanólico do fruto de <i>Buchenavia</i> sp.	41
Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos de ratos tratados com as frações acetato de etila e aquosa do extrato etanólico do fruto de <i>Buchenavia</i> sp. em única administração	42

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Registro do número de estros de ratas expostas ao tratamento com EEtOH-B (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) e controle (H ₂ O _d , v.o.), 16 dias antes do tratamento, 16 dias em tratamento e 16 dias pós-tratamento	61
Tabela 2 - Registro do consumo médio \pm desvio padrão (DP) de água e ração dos grupos experimentais durante o período gestação gestacional de <i>Rattus norvegicus</i> var. Wistar	61
Tabela 3 - Evolução ponderal média \pm DP da massa corporal dos grupos experimentais EEtOH-B (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) e controle (H ₂ O _d , v.o.) durante o período gestacional de <i>Rattus norvegicus</i> var. Wistar.....	61
Tabela 4 - Efeito do EEtOH-B (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) e controle (H ₂ O _d , v.o.), administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos de ratas Wistar gestantes, período de tratamento 20 dias consecutivos	61
Tabela 5 - Efeito do EEtOH-B (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) e controle (H ₂ O _d , v.o.), administrados por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas, tratadas durante o período gestacional.....	62
Tabela 6 - Efeito do EEtOH-B (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) e controle (H ₂ O _d , v.o.), administrados por via oral sobre a contagem diferencial de leucócitos em ratas Wistar adultas, tratadas durante o período gestacional	62
Tabela 7 - Massa absoluta dos órgãos de ratas Wistar gestantes submetidas aos tratamentos EEtOH-B (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) e controle (H ₂ O _d , v.o.), durante 20 dias	62
Tabela 8 - Massa absoluta da prole e placenta de ratas Wistar gestantes submetidas aos tratamentos EEtOH-B (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) e controle (H ₂ O _d , v.o.), durante 20 dias.....	62
Tabela 9 - Efeito do EEtOH-B (250, 500 e 1000 mg/kg, v.o.) e controle (H ₂ O _d , v.o.), administrados por via oral sobre a prole de ratas Wistar adultas, tratadas durante o período gestacional.....	63
Tabela 10 - Média do peso de ratos tratados com o extrato etanólico do fruto de <i>Buchenavia</i> sp. durante 60 dias	63
Tabela 11 - Consumo de água e ração de ratos tratados com o extrato etanólico do fruto de <i>Buchenavia</i> sp. durante 60 dias.....	63
Tabela 12 - Massa dos órgãos reprodutivos de ratos tratados com o extrato etanólico do fruto de <i>Buchenavia</i> sp. durante 60 dias.....	63
Tabela 13 - Parâmetros hematológicos de ratos tratados com o extrato etanólico do fruto de <i>Buchenavia</i> sp. durante 60 dias.....	64
Tabela 14 - Parâmetros bioquímicos de ratos tratados com o extrato etanólico do fruto de <i>Buchenavia</i> sp. durante 60 dias (toxicidade reprodutiva).....	64

RESUMO

FERREIRA, M. D. S. **TOXICIDADE SISTÊMICA E REPRODUTIVA DO FRUTO DE *Buchenavia* sp. EM ROEDORES.** 2016. 81f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

Atualmente, são conhecidas 131 espécies de plantas tóxicas para animais de produção no Brasil em 79 gêneros, sendo que na região Nordeste são conhecidas pelo menos 42. Algumas espécies do gênero *Buchenavia* são apontadas como tóxicas por produtores da Região Norte do Piauí, provocando aborto em ruminantes, mas ainda sem comprovação científica. Considerando a necessidade de investigar este aspecto, este trabalho teve por objetivo geral: investigar os possíveis efeitos adversos induzidos pelo extrato etanólico formulado a partir do fruto de *Buchenavia* sp. nos diferentes esquemas de dosificação sobre o sistema reprodutivo de ratas, observando a influência sobre a prenhez e ciclo estral, toxicidade reprodutiva em ratos, bem como, estudo de toxicidade aguda, e ensaio de letalidade com *Artemia salina*. Realizaram-se ainda análises fitoquímicas do extrato etanólico e suas frações. Após cada experimento, os animais foram submetidos a punção intracardiaca para coleta de sangue, para avaliação bioquímica dos parâmetros séricos: fosfatase alcalina, transaminase glutâmica oxaloacética, transaminase glutâmica pirúvica, uréia, creatinina. Os animais foram eutanasiados por excesso da associação anestésica de ketamina e xilazina para remoção e pesagem dos órgãos: ovários, fígado, baço, rins, coração, pulmão e adrenais, para aferição das massas e análise histopatológica. Os resultados foram submetidos a Análise de variância (ANOVA). As diferenças foram avaliadas pelo Teste de Tukey. Os resultados do estudo fitoquímico apresentam como principais constituintes fitoquímicos as seguintes classes de compostos: fenóis simples, leucoantocianidinas, flavanonas e triterpenos pentacíclicos. O valor da CL50 foi de 37,29 µg/mL no ensaio de letalidade com *Artemia salina*, demonstrando atividade biológica frente ao microcrustáceo, com indícios de toxicidade. Verificou-se que as frações acetato de etila e aquosa do extrato etanólico do fruto de *Buchenavia* sp., não apresenta manifestações clínicas de toxicidade aguda, levando-se em considerações a inexistência de diferenças comportamentais entre os grupos, a ausência de alterações no perfil bioquímico e não ter havido morte. Concluí-se que o extrato etanólico do fruto de *Buchenavia* sp. afeta o ciclo estral e o sistema reprodutor de ratas gestantes, causando diminuição do número de fetos, placentas e pontos de implantação. O referido extrato afeta o sistema reprodutor de ratos machos em virtude da observação da redução da massa de testículos (EEtOH-fB 500mg/kg) e epidídimos (EEtOH-fB 250, 500 e 1000mg/kg) em grupos tratados, tendo a possibilidade de reduzir a fertilidade.

Palavras-chave: *Buchenavia* sp. Planta tóxica. Machos. Fêmeas. Fertilidade.

ABSTRACT

FERREIRA, M. D. S. **TOXICITY AND REPRODUCTIVE *Buchenavia* sp. FRUIT IN RODENTS.** 2016. 81f. Thesis (Doctorate in Animal Science) - Graduate Program in Animal Science, Federal University of Piauí, Teresina, 2012.

Currently, there are 131 known species of toxic plants for production animals in Brazil in 79 genera, and in the Northeast are known at least 42. Some species of the genus *Buchenavia* are identified as toxic by producers in North Piauí region, causing abortion ruminants, but still no scientific proof. Considering the need to investigate this aspect, this study was overall objective: to investigate the possible adverse effects induced by ethanol extract made from the fruit of *Buchenavia* sp in different dosage schemes, on the reproductive system of rats, observing the influence on pregnancy and estrous cycle, reproductive toxicity in rats, as well as study of acute toxicity and lethality test with *Artemia salina*. They were held still phytochemical analysis of the ethanol extract and its fractions. After each experiment, the animals underwent intracardiac puncture for blood collection for biochemical evaluation of serum parameters: alkaline phosphatase, transaminase glutamic oxaloacetic, glutamic pyruvic transaminase, urea, creatinine. The animals were euthanized by excess anesthetic combination of Ketamine and Xylazine to remove and weigh organs: ovaries, liver, spleen, kidneys, heart, lung and adrenal glands, to measure the masses and analysis histopathology. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA). Differences were evaluated by the Tukey test. The results of the phytochemical study phytochemicals present as main constituents the following classes of compounds: simple phenols, leucoanthocyanidins, flavanones and pentacyclic triterpenes. The LC50 value was 37.29 mg/ml in lethality test with *Artemia salina*, demonstrating biological activity against the microcrustacean being considered toxic. It was found that the fractions ethyl acetate and aqueous ethanolic extract of the fruit *Buchenavia* sp., Has no clinical signs of acute toxicity, taking into consideration the lack of behavioral differences between groups, the absence of alterations in biochemical profile and have been no death. It was concluded that the ethanol extract of the fruit of *Buchenavia* sp. affect the estrous cycle and the reproductive system of pregnant rats, causing decrease in the number of fetuses, placentas and deployment points. The said extract affects the reproductive system of male rats under observation of mass reduction of testes (EEtOH-fB 500mg / kg) and epididymis (EEtOH-fB 250, 500 and 1000mg / kg) treated group, which may lead to reduced fertility.

Keywords: *Buchenavia* sp. toxic plant. Males. Females. Fertility.

1. INTRODUÇÃO

Plantas tóxicas de interesse pecuário são definidas como aquelas que quando ingeridas pelos animais de produção, sob condições naturais, causam danos a saúde ou mesmo a morte. De modo geral a ingestão ocorre por decorrência da falta de pastagens e escassez de alimentos, considerados os principais fatores, que quando associado ao período de estiagem agrava a ocorrência de intoxicações, mesmo quando se trata de plantas com pouca palatabilidade (BARBOSA et al., 2007, TOKARNIA et al., 2012).

No Brasil há grandes perdas econômicas que podem ser diretas, por mortes ou diminuição da produção e indiretas, que envolvem mudanças no manejo habitual, despesas veterinárias e controle das plantas tóxicas na propriedade. Concomitante a estes fatos, o impacto econômico estimado em 2001 foi de cerca de 160 a 224 milhões de dólares (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001).

Os estudos de toxicidade, em laboratório, são realizados com ratos, porque os resultados obtidos com esta espécie, permitem fazer uma inferência para outras espécies animais e também para o homem (MARCONDES; BOANCHI; TANO, 2001).

A toxicidade aguda e crônica de substâncias pode ser avaliada por meio de observações do comportamento, variações no consumo de ração, evolução ponderal, avaliação biométrica dos órgãos e alterações orgânicas visualizáveis macro e microscopicamente. As determinações hematológicas e bioquímicas sanguíneas são fundamentais para predizer a influência da substância-teste sobre a homeostase e o estado das funções hepática e renal (OECD's, 2008). A toxicidade reprodutiva também pode ser observada, e refere-se à interferência tóxica na capacidade reprodutiva tanto de machos, quanto de fêmeas, incluindo o desenvolvimento pré-natal.

As plantas que afetam a reprodução podem ser divididas em abortivas, de ação estrogênica ou causadoras de malformações congênitas. No Brasil, entre o grupo de plantas abortivas, *Tetrapteryx* spp, *Ateleia glazioviana*, *Stryphnodendron obovatum* e *Aspidosperma pyrifolium*, tem sua toxicidade comprovada experimentalmente (TOKARNIA et al., 2012). *Tetrapteryx* spp é encontrada nas regiões Sudeste, Norte e Centro-Oeste (TOKARNIA et al., 1989, CARVALHO et al., 2006), já *A. glazioviana* ocorre na região Sul (GAVA et al., 1993, GAVA et al., 2003), ambas são abortivas para bovinos em qualquer fase da gestação e também provocam alterações cardíacas (RAFFI et al., 2004; GARCIA Y SANTOS et al., 2004; RIET-CORREA, 2005). *S. obovatum* causa abortos, sinais digestivos e provavelmente

fotossensibilização em bovinos na região do cerrado (TOKARNIA et al., 2012). *A. pyrifolium* ocorre no semiárido da região Nordeste e é abortiva para caprinos (RIET-CORREA, 2007). Experimentalmente, observou-se que algumas plantas podem desencadear o estado de infertilidade em machos, Gupta et al. (2006) verificou que o extrato metanólico da casca do caule de *Albizia lebbbeck* L. Beth quando administrado por via oral pode levar a um estado de infertilidade em ratos devido a interferência no processo de espermatogênese.

Levantamentos realizados por Costa (2009) e Mello et al. (2010), demonstraram a incidência de plantas conhecidas como tóxicas, mas sem comprovação científica em regiões dos estados do Tocantins e Piauí respectivamente. Dentre as citadas como tóxicas para a reprodução se destaca a *Buchenavia tomentosa*, popularmente conhecida por “merindiba”, “birindiba” ou “mirindiba”.

A *B. tomentosa* pertencente ao reino Plantae, filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Myrtales, família Combretaceae e gênero *Buchenavia*, a espécie *Buchenavia tomentosa* pode chegar a 5-15m de altura, copa ampla e densa, tronco curto, folhas simples. Floração de setembro-outubro e frutificação agosto-setembro. Habita cerrado e mata latifoliada (LORENZI, 2002), campo cerrado, caronal, capão de cerrado, solos arenosos (POTT; POTT, 1994). A quantidade de frutos varia a cada ano, se em um ano a planta produz mais, no ano seguinte a produção é menor. Como os frutos são muito palatáveis os animais se alimentam avidamente (MELLO et al., 2010).

Baseado nas informações acima é importante o estudo da toxicidade da sistêmica bem como reprodutiva da *Buchenavia* sp e com isso contribuir o estudo das plantas no Piauí .

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

- Descrever a toxicidade sistêmica e reprodutiva de frutos de *Buchenavia* sp em roedores.

1.1.2 Específicos

- Detectar componentes fitoquímicos presente no extrato etanólico dos frutos de *Buchenavia* sp e nas frações acetato de etila e aquosa.
- Avaliar a toxicidade aguda dos frutos de *Buchenavia* sp.
- Avaliar a toxicidade dos frutos de *Buchenavia* sp frente à *Artemia salina*.
- Observar e descrever a influência dos frutos de *Buchenavia* sp sobre o ciclo estral de ratas.

- Averiguar a toxicidade dos frutos de *Buchenavia* sp em fêmeas gestantes e sua prole.
- Descrever a possível toxicidade dos frutos de *Buchenavia* sp em órgãos do sistema reprodutivo de ratos machos.
- Avaliar a morfologia dos espermatozoides de roedores submetidos à ingestão de extrato do fruto de *Buchenavia* sp.

1.2 Estruturação da Tese

A Tese está organizada em partes: Introdução, Revisão de Literatura e Considerações Finais, redigidas segundo as normas editoriais do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí e dois capítulos, na forma de artigos científicos submetidos à publicação, assim intitulados: Capítulo I - Análise fitoquímica e toxicidade dos extratos do fruto de *Buchenavia* sp. (Combretaceae), formatado de acordo com as normas editoriais da revista Archives of Veterinary Science; Capítulo II - Avaliação do potencial tóxico reprodutivo do extrato etanólico do fruto de *Buchenavia* sp. em ratos Wistar, formatado de acordo com as normas editoriais da revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A pecuária piauiense e as plantas tóxicas

Na natureza, um grande número de espécies vegetais apresenta princípios ativos capazes de promover distúrbios em animais. No entanto, são classificadas como plantas tóxicas de interesse pecuário, as espécies que promovem intoxicação nos animais, mas apenas sob condições naturais. Nesse sentido, nem todas as plantas demonstradas experimentalmente como tóxicas devem ser consideradas plantas tóxicas de interesse pecuário por não produzirem quadros clínico patológicos sob condições naturais (TOKARNIA et al., 2012).

As intoxicações por plantas representam uma importante causa de doenças nos animais de produção. No Brasil, o número de plantas conhecidas como tóxicas para ruminantes e equinos aumenta continuamente, havendo aproximadamente 131 espécies de 79 gêneros conhecidos. Apesar de mais de uma centena de espécies de plantas tóxicas serem conhecidas no país, há poucas responsáveis pela maioria das perdas econômicas. No entanto, a importância toxicológica varia de acordo com a região e a espécie afetada (PESSOA et al., 2013; PEDROZA, 2015).

No nordeste, a pecuária configura como uma das principais atividades econômicas e no Estado do Piauí, foi a primeira atividade econômica desenvolvida, fazendo parte de sua tradição histórica, e ainda hoje constitui um dos pilares de sua economia. Entre os rebanhos, destacam-se os caprinos, bovinos, suínos, ovinos e asininos. O efetivo de rebanho bovino no Estado está estimado em 1.660.099 animais; o de caprinos corresponde a 1.234.403 e o de ovinos é 1.210.967 cabeças (IBGE, 2014).

Como em toda pecuária extensiva, as plantas daninhas e as plantas tóxicas são um dos problemas mais significativos por originarem grandes perdas econômicas à produção animal (POTT et al., 2006; BARBOSA *et al.*, 2007).

A mortalidade de animais decorrente da ingestão de plantas tóxicas é, sem dúvida alguma, o que mais chama a atenção, especialmente quando afeta uma grande porcentagem do rebanho. Contudo, outras perdas igualmente importantes são: diminuição dos índices reprodutivos (aborto, defeitos congênitos, distúrbios hormonais), redução da produtividade dos animais sobreviventes, doenças transitórias, e diminuição da produção de leite, carne e lã (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001).

Em um levantamento realizado por Mello et al. (2010) sobre as principais plantas tóxicas de interesse pecuário na Mesorregião do Norte Piauiense, na visão de Médicos Veterinários,

Engenheiros Agrônomos, técnicos agrícolas e produtores rurais, foram identificadas como comprovadamente tóxicas 15 espécies, dentre elas: *Ipomoea asarifolia*, *Stryphnodendron coriaceum*, *Thiloa glaucocarpa*, *Manihot* spp. e *Piptadenia macrocarpa*, e sete outras foram apontadas como tóxicas, porém sem comprovação de sua toxicidade: *Buchenavia tomentosa*, *Caesalpinia* sp., *Brunfelsia* sp., *Luetzelburgia* sp., *Hybanthus ipecaconha*, *Phisalys angulata* e *Spondias luta*.

2.2 Toxicidade reprodutiva causada por plantas

A toxicologia reprodutiva investiga os efeitos adversos produzidos pela exposição de substâncias, naturais ou sintéticas, no organismo a se desenvolver. Os efeitos adversos incluem alterações no sistema reprodutivo, produção e transporte de gameta, ciclo reprodutivo, fertilidade e incidência de partos prematuros. As proles podem ser afetadas pela exposição parental antes da concepção e durante o período do desenvolvimento pré-natal (NEUBERT; CHAHOUD, 1995; OECD, 2004. LEMONICA et al., 2008).

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

As plantas teratogênicas além de causarem problemas fetais e embrionários visíveis também podem causar abortos, que compreende a expulsão do concepto antes do término do período normal de gestação, quando ele ainda é incapaz de se manter vivo. Abortar é expulsar o feto inviável em consequência de morte intra-uterina, entre estas, encontram-se *Veratrum californicum* e *V. viride* e *Mimosa tenuiflora* que induzem deformidades craniofaciais em cordeiros (KNIGHT; VALTER, 2004; DANTAS et al., 2012). Outras plantas com potencial teratogênico são *Conium maculatum*, *Nicotiana* spp. *Astragalus* spp. e *Oxytropis* spp., que induzem múltiplas deformidades ósseas ou contraturas congênitas nas extremidades, especialmente na flexão de carpo, e palato fendido (RODRÍGUEZ; PÉREZ, 2003); Algumas espécies de *Copaifera* possuem ácidos diterpênicos, entre eles o ácido caurenóico, aos quais é atribuída a capacidade de produzir alterações na musculatura lisa do estômago e do útero, bem como de induzir citotoxicidade e embriotoxicidade (COSTA-LOTUFO et al., 2002; CUNHA et al., 2003; TIRAPELLI et al., 2004).

Uma manifestação tóxica ocorre a partir do momento em que a capacidade de biotransformação e eliminação de agentes tóxicos em um organismo é excedida. Muitas alterações no organismo gestante podem influenciar o metabolismo e excreção de compostos como, por exemplo, os xenobióticos. Ainda, alterações fisiológicas no organismo materno como modificações hormonais e aumento da filtração glomerular, afetam as propriedades farmacocinéticas da substância tóxica, havendo, conseqüentemente uma diferença de respostas e magnitude de respostas entre um organismo gestante e um não gestante (NATIONAL RESEARCH CONCIL, 1989).

O desenvolvimento dos vertebrados, desde o momento da concepção até a morte é caracterizado por um intrigante e complexo processo. Existem numerosos momentos durante o desenvolvimento, especialmente na fase pré-natal, no qual o organismo se torna mais vulnerável a situações adversas (ACUFF-SMITH; VORHEES, 1999). Após a fecundação, para que o conceito tenha um desenvolvimento normal, são fundamentais dois fatores: a herança genética e o ambiente intra-uterino adequado (LEMÔNICA, 2003).

Historicamente, o ciclo reprodutivo é dividido em três segmentos que são: segmento I- também conhecido como estudo de fertilidade e reprodução, que compreende do período de pré-acasalamento até a implantação do ovo; segmento II- também conhecido como toxicologia do desenvolvimento ou teratologia, que vai do período de implantação e organogênese, até o fechamento do palato duro, no 15º dia gestacional; segmento III- estudos perinatal e pós-natal, compreendendo o final da gestação e o desenvolvimento pós-natal, usualmente até o vigésimo primeiro dia de vida dos neonatos (KELLER, 2001; HOOD, 2006).

O aborto é a interrupção da gestação pela morte do embrião ou feto. A ingestão de plantas que podem induzir o aborto envolve o risco de grave intoxicação, podendo resultar na morte do animal ou em futuras complicações reprodutivas (MOREIRA et al., 2001; ROEHSIG et al., 2011). Além do aborto pode ocorrer mumificação ou maceração após a morte fetal. A mumificação caracteriza-se pela morte do feto, que não é abortado, havendo em vez disso, reabsorção dos fluidos placentários. A maceração é seguida por invasão bacterina uterina por via hematogênica, com posterior infecção piogênica (PACHECO, 1997; ACLAND, 1998; JAINUDEEN; HAFEZ, 2004).

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

Em animais de produção, a jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), o pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*), timbó ou maria-preta (*Ateleia glazioviana*), cipó-ruão ou cipó-preto (*Tetrapterys acutifolia*), cipó-ferro (*Tetrapterys multiglandulosa*), cabacinha (*Luffa acutangula*) e melosa (*Stemodia maritima*) são apontadas como abortivas (RIET-CORREIA; MEDEIROS, 2001; GAVA; BARROS, 2001; GAVA et al., 2001; MEDEIROS et al., 2004; SOUZA-LIMA; SOTO-BLANCO, 2010), embora algumas destas ainda careçam de investigação científica mais aprofundada.

2.3 A Família *Combretaceae*

A família *Combretaceae* compreende cerca de 475 espécies e 20 gêneros, com distribuição pantropical e a maioria das espécies ocorrem na África. A característica mais marcante do grupo é a presença de tricomas compartimentados (MARQUETE; VALENTE 1997). No Brasil ocorrem cinco gêneros nativos desta família: *Buchenavia*, *Crombretum*, *Conocarpus*, *Terminalia* e *Thiloa*, com aproximadamente 60 espécies, e dois exóticos: *Bucida* e *Quisqualis* (MARQUETE; VALENTE, 1997; SOUZA; LORENZI, 2005).

Para alguns gêneros pertencentes a esta família, sobretudo o *Combretum*, são descritas diversas classes de metabólitos secundários tais como di e triterpenos e seus derivados glicosilados, estilbenos, flavonóides, taninos e outros compostos aromáticos, a que poder ser atribuídas atividades farmacológicas e/ou efeitos tóxicos (CHOWDHURY; ISLAM, 2004; BISOLI et al., 2008; BATISTA et al., 2010).

2.3.1 O gênero *Buchenavia*

O gênero *Buchenavia* (Reino: Plantae; Divisão: Magnoliophyta; Classe: Magnoliopsida; Ordem: Myrtales; Família: Combretaceae) com cerca de 25 espécies, está distribuído na América Tropical, desde a América Central, em Cuba, Trinidad, Panamá, Índias Ocidentais, até Venezuela, Colômbia, Guianas, Brasil, Peru e Bolívia. Na região amazônica, há a maior concentração, chegando a vinte o número de espécies; no sudeste do Brasil ocorrem seis; e uma é encontrada na região sul (MARQUETE; VALENTE, 2005).

As árvores deste gênero são caracterizadas por porte arbustivo, folhas alternas, aglomeradas no ápice, presença somente de tricomas combretáceo-compartimentados. As inflorescências possuem formato em espigas. As flores não possuem pétalas, estames com

anteras adnatas aos filetes. Os frutos são drupóides, arredondados e as sementes apresentam cotilédones convolutos (MARQUETE; VALENTE, 2005).

No Brasil, a *Buchenavia tomentosa* Eichler é uma planta arbórea encontrada na Floresta Amazônica, caatinga e cerrado brasileiro (CAVALCANTI et al., 2003; MARQUETE; VALENTE, 2005). É considerada nativa dos cerradões e de mata semidecíduas, possuindo a altura média de 5 a 12m e com o diâmetro do tronco de 30 a 50 cm (LORENZI, 2002). Ocorre em diversos estados e no Piauí é conhecida popularmente como mirindiba ou birindiba (MELLO et al., 2010).

As propriedades químicas e farmacológicas das espécies do gênero *Buchenavia* ainda não são bem conhecidas. Triterpenóides já foram isolados nas folhas de *Combretum collinum* (ROGER; COOMBES, 1999). Em *Combretum mellifluum* foram isolados os triterpenos lupenona, lupeol e ácido betulínico nas raízes e frutos (ROCHA et al., 2007). Em *Combretum fragans* foram identificados taninos, flavonóides e poucas saponinas (BATAWILA et al., 2005). Sabe-se que muitas substâncias pertencentes a estes agrupamentos químicos possuem efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo de mamíferos (CHHABRA; MAHUNNAH; MSHIU, 1987; FALODUN; USIFOH; NWORGU, 2005).

Taninos e terpenos foram isolados das folhas verdes de *Buchenavia oxicarpa* (HERNES; HEDGES, 2004). Flavonóides alcalóides Buchenavianina e *N*-Dimetilbuchenavianina foram identificados em folhas e frutos de *Buchenavia macrophylla* Eichler; *O*-Demetilbuchenavianina, *O*, *N* - Demetilbuchenavianina, *N* - Demetilcapitavina, 5,7 - Dihidroxi - 6 - (*N* - metil - 20-piperidinil) flavanona foram descritos em frutos de *B. macrophylla*; e capitavina e 5,7,49-Trihidroxi-6-(*N*-metil-20-piperidinil) flavona em sementes de *Buchenavia capitata* Eichler (HOUGHTON, 2002).

Algumas espécies do gênero *Buchenavia* já foram estudadas quanto às propriedades medicinais. As folhas de *B. capitata* demonstraram atividade anti-HIV e citotóxica (BEUTLER et al., 1992) e o extrato etanólico da raiz de *B. parviflora* apresentou atividade inibidora da enzima *Fatty Acid Synthase* - FAS (LI et al., 2002).

Os estudos toxicológicos envolvendo a *B. tomentosa* (Figura 1) ainda são escassos, porém ha relatos de criadores de gado do Tocantins e do Piauí de que a ingestão de seus frutos maduros estaria, de alguma forma, associada a ocorrência de abortos, diarreia, fraqueza, perda de peso, nascimento de animais fracos e ate de óbitos (COSTA, 2009; MELLO et al., 2010).



Figura 1: *Buchenavia tomentosa*. Fonte: MELLO et al., (2010).

No trabalho investigativo realizado no norte do Piauí, por Mello et al.,(2010), a *B. tomentosa* foi citada (por vinte entrevistados) como tóxica para caprinos, ovinos bovinos que se alimentam dos frutos que caem espontaneamente, sendo a responsável pelo maior número de abortamentos mencionado no estudo (50 abortos num rebanho de 350 animais). Os sinais clínicos relatados foram diarreia, focinho seco, fraqueza, perda de peso, nascimento de animais fracos e abortamento, sendo que alguns animais vêm a óbito.

Em um estudo onde o fruto da *B. tomentosa* foi adicionado a dieta de ratas prenhes para verificação de parâmetros reprodutivos, desenvolvimento físico e reflexológico da prole, foi observada que a adição do fruto da *B. tomentosa* a 10% na dieta durante a prenhez pode provocar alterações gestacionais, podendo modificar o desenvolvimento físico da prole, evidenciado por distúrbios de peso e consumo de ração das mães, e diferenças de peso encontrado nos filhotes machos, indicando uma toxicidade moderada da planta, o que, segundo os autores, decorre possivelmente da ação dos flavonóides presentes na mesma. Porém, em relação aos parâmetros neurocomportamentais da prole não foram relatadas alterações (NUNES *et al.* 2010). Ferreira et al., (2016) demonstrou não haver toxicidade sobre ciclo estral, gestação e prole de ratas ao utilizar extrato etanólico oriundo da casca da árvore, entretanto a porção da planta ingerida pelos animais é o fruto (COSTA, 2009; MELLO et al., 2010).

Assim, estudos devem ser conduzidos para melhor investigar se realmente a *Buchenavia* sp., induz toxicidade, qual a evolução e quais são os prováveis efeitos tóxicos que podem ser ocasionados por seu consumo.

2.4 Testes utilizados na avaliação de toxicidade de plantas em animais

A toxicologia envolve o estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos adversos de substâncias químicas ou outros materiais sobre organismos expostos. Os testes de toxicidade consistem em se expor organismos representativos durante um período determinado a varias concentrações de uma ou mais substâncias e avaliar os efeitos causados. Os efeitos tóxicos vão desde a mortalidade até efeitos chamados subletais, tais como mudanças no crescimento, na reprodução, no comportamento, entre outros (ABRAHÃO; SILVA, 2002; MELO, 2015).

Os efeitos deletérios podem ser de dois tipos, agudo ou crônico. O efeito agudo é definido como uma resposta severa e rápida a um estímulo, a qual se manifesta num intervalo curto, variando de 0 a 96 horas. O efeito crônico é normalmente resultado de exposições repetidas ou de longa duração, geralmente com baixas concentrações de exposição (ABRAHÃO; SILVA, 2002; MELO, 2015)

A toxicidade aguda e crônica de substâncias pode ser avaliada por meio de observações do comportamento, variações no consumo de ração, evolução ponderal, avaliação biométrica dos órgãos e alterações orgânicas visualizáveis macro e microscopicamente. As determinações hematológicas e bioquímicas sanguíneas são fundamentais para predizer a influência da substância-teste sobre a homeostase e o estado das funções hepática e renal (OECD's, 2001).

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

Diversos compostos químicos, sejam oriundos de plantas ou sintéticos, podem afetar o ciclo reprodutivo em qualquer das suas diferentes fases, interferindo temporariamente na reprodução ou causando defeitos de desenvolvimento na prole exposta. Desta forma, os estudos de toxicidade reprodutiva devem ser abrangentes para que se possam detectar diferentes tipos de agravos nas distintas fases do ciclo reprodutivo (MELLO, 2007).

De uma maneira geral, os estudos mais utilizados para avaliações que envolvem toxicidade reprodutiva em mamíferos, incluindo o homem, adaptados das normas da Agência Americana de Proteção Ambiental (US EPA, 1996) são os recomendados pela *Food and Drugs*

Administration (FDA), divididos em três segmentos: período perinatal, que inicia antes da concepção; período pré natal, se inicia na concepção e termina na lactação; e período neonatal, que inicia com o parto e se estende até o início das características sexuais secundárias (BERNARDI, 2006; HOLENBACH et al., 2010).

Os estudos de toxicidade realizados com ratos são importantes porque permitem fazer uma inferência de resultados para outras espécies animais e também para o homem, considerando-se algumas similaridades no comportamento reprodutivo dessas espécies (MARCONDES; BOANCHI; TANO, 2001).

Alguns testes são utilizados para detectar efeitos adversos em fêmeas prenhes sobre o desenvolvimento dos embriões e fetos. A Agência Americana de Proteção ao Meio Ambiente (US EPA) instituiu o Comitê Consultivo de Testes e Triagem de Desreguladores Endógenos (EDSTAC – ENDOCRINE DISRUPTERS SCREENING AND TESTING ADVISOR COMMITTEE) que propõe e valida os testes nessa área, o qual recomenda protocolos *in vivo*, abrangendo diferentes períodos de exposição (US EPA, 1996).

Devido ao curto período de duração do ciclo estral de ratas, com média de quatro ou cinco dias, este constitui um bom modelo para o estudo das alterações que ocorrem durante o ciclo reprodutivo em estudos de toxicidade (MARCONDES; BIANCHI; TANNON, 2001; VANONI, 2006; GOLDMAN et al., 2007).

No entanto, a sociedade atual vem exigindo a redução na utilização de animais para pesquisas científicas, fazendo com que testes *in vitro* sejam cada vez mais empregados. Dentre esses testes pode-se citar o ensaio toxicológico frente à *Artemia salina*.

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

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

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de DL50 abaixo de 1000ppm em *A. salina* (MEYER et al., 1982). Normalmente os testes de toxicidade são elaborados com objetivo de avaliar ou prever os

efeitos tóxicos em sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES; FORBES, 1994).