



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

NATALIE EMANUELLE RIBEIRO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA, SUBAGUDA E REPRODUTIVA DO
EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Chrysobalanus icaco* L.**

Recife

2017

NATALIE EMANUELLE RIBEIRO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA, SUBAGUDA E REPRODUTIVA DO
EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Chrysobalanus icaco* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof. Dra Teresinha Gonçalves da Silva

Recife

2017

Catálogo na Fonte:

Teresa Cristina Moreira de Lucena, CRB-4/ 1419

Rodrigues, Natalie Emanuelle Ribeiro

Avaliação da toxicidade aguda, subaguda e reprodutiva do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* L./ Natalie Emanuelle Ribeiro Rodrigues. – 2017.

119 f. : il., fig., tab.

Orientador: Teresinha Gonçalves da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, Recife, 2017.

Inclui referências e anexo

1. *Chrysobalanus icaco* L. 2. Embriogênese 3. Organogênese I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orient.) II. Título

570

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-556

NATALIE EMANUELLE RIBEIRO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA, SUBAGUDA E REPRODUTIVA DO
EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE CHRYSOBALANUS ICACO L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Aprovada em: 22/ 06/ 2017

BANCA EXAMINADORA

Profª Dra. Teresinha Gonçalves da Silva/ UFPE

Profª Dra. Paloma Lys de Medeiros/ UFPE

Prof. Dr. Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho/ (UNIFAVIP | DeVry)

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira/ UFRPE

Profª Dra. Ivone Antônia de Souza/ UFPE

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares/ UFPE

Dra. Isla Vanessa Gomes Alves Bastos/ UFPE

A minha mãe, **Sonia Ribeiro e Silva**, aos meus filhos, **Kauã Ribeiro Cardoso** e **Lilian Emanuelle Ribeiro Rodrigues** e ao meu esposo **Marcelo Ferreira Rodrigues**, por todo apoio, paciência e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado em cada passo durante minha jornada acadêmica, pelas bênçãos e misericórdias derramadas sobre minha vida.

A minha orientadora, Prof^a Dra. Teresinha Gonçalves da Silva, pela oportunidade concedida, por ter acreditado no meu trabalho e potencial, pela brilhante orientação, paciência e ensinamentos que contribuíram para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr Valdemiro Amaro da Silva Junior, pela atenção e ajuda dada no experimento de histologia.

Ao Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, pela competência e ajuda na parte histológica.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe, Sonia Ribeiro e Silva, meu grande amor, minha inspiração, minha base, meu tudo.

Aos meus filhos, Kauã Ribeiro Cardoso e Lilian Emanuelle Ribeiro Rodrigues, meu combustível diário para conseguir alcançar meus objetivos.

Ao meu esposo, Marcelo Ferreira Rodrigues, por todo amor, companheirismo e compreensão em todos os momentos em que precisei estar ausente.

As minha amigas, Regina Souza Aires e Juliane da Silva Farias, por toda amizade, carinho, apoio e pelas maravilhosas conversas, vocês foram fundamentais no momento mais difícil do doutorado. Obrigada por tudo, amo vocês.

A todos os colegas do Laboratório de Prospecção Farmacológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX). Em especial a Tatiane Oliveira, pela indispensável ajuda durante os experimentos, pela troca de conhecimento e por ser sempre solícita.

Aos meus amigos: Temístocles l'talo, Cynthia Layse, Sandrine Arruda, Karla Marques e Jeyce Andrade, pelo convívio, colaboração e pelo grande laço de amizade.

A Alisson Rodrigo da Silva Oliveira, do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Bioativos da UFPE, por toda ajuda no protocolo experimental, pela paciência e disponibilidade em me auxiliar.

A Paulo Germano Brito, secretário do Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, por toda dedicação, profissionalismo e boa disposição sempre.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

E a todos aqueles que passaram pela minha vida e ajudaram de forma direta ou indireta para concretização desse sonho.

RESUMO

Chrysobalanus icaco L., Chrysobalanaceae, é popularmente utilizada no tratamento de várias doenças devido às propriedades farmacológicas dos seus compostos bioativos. Apesar de sua ampla utilização na medicina popular, existe uma carência de estudos na literatura sobre a toxicidade dessa espécie. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos toxicológicos agudo, subagudo e reprodutivo do extrato aquoso das folhas de *C. icaco* (EAF*ci*). Inicialmente foi analisado o perfil fitoquímico por cromatografia em camada delgada (CCD) e posteriormente os teste de toxicidade aguda em camundongos *Swiss* fêmeas (dose de 2.000 mg/kg por via oral), toxicidade subaguda (doses de 100, 200 e 400 mg/kg, via oral, por 28 dias consecutivos) em camundongos *Swiss* machos e fêmeas, de acordo com protocolos estabelecidos pela OECD. Nos testes de toxicidade reprodutiva, ratas Wistar foram tratadas com EAF*ci* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, durante o período de pré-implantação e período de organogênese. Os dados foram analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$) e Kruskal-Wallis. A análise fitoquímica do EAF*ci* revelou a presença de taninos e flavanoides. A administração, em dose única e por via oral, do EAF*ci* (2.000 mg/kg), não causou sinais de toxicidade ou morte. O tratamento por 28 dias consecutivos com o EAF*ci* não alterou o consumo de água nem o perfil hematológico em ambos os sexos. Todavia, foi detectada uma diminuição na massa corpórea e no consumo de ração dos animais a partir da segunda semana de tratamento. Os níveis de AST e ALT apresentaram-se elevados em ambos os sexos nas diferentes doses de tratamento. Não foram observadas alterações nos pesos absolutos e relativos do fígado, rim e baço, bem como na morfologia macroscópica externa dos mesmos. A análise microscópica dos rins revelou redução do espaço subcapsular dos glomérulos renais e congestão dos vasos na cortical nos machos e fêmeas tratados. No fígado, observou-se congestão das veias centro lobulares e hepatócitos com citoplasma vacuolado nos animais de ambos os sexos que receberam o EAF*ci*. Adicionalmente, foi observado uma redução do parênquima lobular e aumento do não lobular do fígado e aumento no diâmetro e volume dos glomérulos nos rins dos animais (machos e fêmeas) dos grupos tratados em relação ao grupo controle. As ratas prenhes tratadas durante o período de pré-implantação não apresentaram sinais de toxicidade reprodutiva. A ratas que receberam o EAF*ci* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, entre o 6º e 15º dia de gestação, não manifestaram sinais de toxicidade sistêmica materna e nem apresentaram diferença significativa nos parâmetros gestacionais e embriotóxicos, foram observadas algumas alterações esqueléticas nos grupos tratados com EAF*ci* como: agenesia de falanges proximais posteriores, agenesia de vertebrae caudais e esternóbrio em borboleta, porém essas alterações não são estatisticamente diferente dos animais controle. Portanto, pode-se sugerir que as doses 100, 200 e 400 mg/kg de EAF*ci* não induz toxicidade reprodutiva nas condições experimentais utilizadas e se revelaram seguras. Todavia as doses testadas promoveram uma baixa toxicidade sistêmica, sendo necessários estudos adicionais relacionados à segurança do extrato.

Palavras chaves: Toxicidade. *Chrysobalanus icaco*. Embriogênese. Organogênese.

ABSTRACT

Chrysobalanus icaco L., Chrysobalanaceae, is popularly used in the treatment of various diseases due to the pharmacological properties of its bioactive compounds. Despite its widespread use in folk medicine, there is a lack of literature studies on the toxicity of this species. Thus, the objective of the present study was to evaluate the possible acute, subacute and reproductive toxicological effects of the aqueous extract of the leaves of *C. icaco* (EAF*ci*). The phytochemical profile was analyzed by thin layer chromatography (CCD) and then the acute toxicity test in female Swiss mice (dose of 2,000 mg / kg orally), subacute toxicity (doses of 100, 200 and 400 mg / kg , orally, for 28 consecutive days) in male and female Swiss mice according to protocols established by the OECD. In the reproductive toxicity tests, Wistar rats were treated with EAF*ci* at doses of 100, 200 and 400 mg / kg during the period of pre-implantation and period of organogenesis. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey test ($p < 0.05$) and Kruskal-Wallis test. Phytochemical analysis of EAF*ci* revealed the presence of tannins and flavanoids. Oral and single dose administration of EAF*ci* (2000 mg / kg) did not cause signs of toxicity or death. The treatment for 28 consecutive days with the EAF*ci* did not alter the water consumption nor the hematological profile in both sexes. However, a decrease in body mass and feed intake was detected from the second week of treatment. AST and ALT levels were elevated in both sexes at different treatment doses. No changes were observed in the absolute and relative weights of the liver, kidney and spleen, as well as the gross macroscopic morphology of the same. Microscopic analysis of the rinses revealed a reduction in the subcapsular space of the renal glomeruli and congestion of the vessels in the cortex in treated males and females. In the liver, we observed congestion of the lobular center veins and hepatocytes with vacuoladonos cytoplasm animals of both sexes that received EAF*ci*. Additionally, a decrease in the lobular parenchyma and increase of the non-lobular of the fig and an increase in the diameter and volume of the glomeruli in the kidneys of the animals (males and females) of the treated groups relative to the control group were observed. Pregnant rats treated during the pre-implantation period showed no signs of reproductive toxicity. The rats that received EAF*ci* at doses of 100, 200 and 400 mg / kg between the 6th and 15th day of gestation showed no signs of maternal systemic toxicity and did not present significant differences in the gestational and embryotoxic parameters, some skeletal changes in the groups groups treated with EAF*ci* as: posterior proximate phalangeal agenesis, caudal vertebral agenesis and sternum in butterfly, but these alterations are not statistically different from control animals. Therefore, it can be suggested that the doses 100, 200 and 400 mg / kg EAF*ci* do not induce reproductive toxicity under the experimental conditions used and have proved to be safe. However, the doses tested promoted a low systemic toxicity, requiring additional studies related to the safety of the extract.

Key words: Toxicity. *Chrysobalanus icaco*. Embryogenesis. Organogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Orientação para testes de produtos químicos- Toxicidade oral aguda	23
Figura 2- Exemplar de <i>Chrysobalanus icaco</i> , A) arbusto; B) folha; C) flores e D) fruto.	35
Figura 3- Útero gravídico de rata com 8 dias de prenhez. As setas indicam pontos de implantação uterina.	44
Figura 4- Ovário de rata com 8 dias de prenhez. As setas indicam os corpos lúteos	45
Figura 5- Útero gravídico de rata com reabsorção prévia (A). Placenta de rata com reabsorção tardia (B)	46
Figura 6- Útero hysterectomizado com as implantações reveladas por NaOH 0,2 %.	47
Figura 7- Análise das anomalias e/ou malformações externas dos fetos de rata Wistar	48
Figura 8- Análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas dos fetos de ratas Wistar tratada com diferentes doses de EAF <i>ci</i> .	52
Figura 9- Pontos de ossificação normal de fetos controles. a) Vista lateral; b) Vista ventral; c) Vista dorsal; d) Esterno: 1- Manúbrio, 2- Centros esternais (Esternébras), 3- Processo xifoide; e) Membro anterior: 1- Escápula, 2- Úmero, 3- Rádio e ulna, 4-Carpos, metacarpos e falanges; f) 1-Fêmur, 2- Tíbia e fíbula, 3- Tarsos, metatarsos e falanges; g) Vista lateral crânio: 1- Supraoccipital, 2- Interparietal, 3- mandíbula; h) Vista ventral crânio: 1- Mandíbula; i) Vista dorsal crânio: 1- Supraoccipital, 2- Interparietal, 3- Parietal, 4- Frontal, 5- Nasal.	53
Figura 10- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAF <i>ci</i> 2.000mg/Kg), por via oral sobre a massa corpórea de camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas (A); Consumo de ração (B) e Consumo de água (C).	56
Figura 11- Fotomicrografia hepáticas (A e B) e renais (C e D) de camundongos fêmeas tratados com o extrato aquoso das folhas de <i>C. icaco</i> . HE. (A e C) Controle e (B e D) EAF <i>ci</i> 2000 mg/kg.	59
Figura 12- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAF <i>ci</i>) no consumo de água por camundongos machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28 dias	61
Figura 13- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus</i>	63

icaco (EAF*Ci*) sobre a massa corpórea de camundongos machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28

Figura 14- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci*) no consumo de ração por camundongos machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28 dias consecutivos. 64

Figura 15: Fitomicrografia dos fígados das fêmeas dos grupos experimentais. (A-B) controle; (C-D) 100mg/kg; (E-F) 200mg/kg; (G-H) 400mg/kg e (I-J) satélite. 76

Figura 16- Fitomicrografia dos fígados dos machos dos grupos experimentais. (A-B) controle; (C-D) 100mg/kg; (E-F) 200mg/kg; (G-H) 400mg/kg e (I-J) satélite. 77

Figura 17- Fitomicrografia dos Rins das fêmeas (A, C, E, G e I) e machos (B, D, F, H e J) dos grupos experimentais. 78

Figura 18- : Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci*) na massa corpórea de ratas Wistar (A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) tratados por via oral durante o período embriogênese (1º ao 6º dia de prenhez). 84

Figura 19- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre o número de sítio de implantações de ratas Wistar tratadas durante o período da embriogênese (1º ao 6º dia de prenhez). 89

Figura 20- Histologia dos sítios de implantação dos animais dos grupos experimentais. (A-B) controle; (C-D) 100mg/kg; (E-F) 200 mg/kg e (G-H) 400mg/kg. 90

Figura 21- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci*) na massa corpórea de ratas Wistar (A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) tratados por via oral durante o período organogênese (6º ao 15º dia de prenhez). 91

Figura 22- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre a razão sexual de ratas Wistar tratadas durante o período da organogênese (6º ao 15º dia de prenhes). 96

Figura 23- Fotomicrografia das placentas dos animais dos grupos experimentais. (A) controle; (B) 100mg/kg; (D) 200 mg/kg e (G-H) 400mg/kg.; 98

Figura 24- Feto do grupo controle com falanges normais (A). Feto do grupo EAF*Ci* com agenesia de falanges posteriores (B). 104

Figura 25: Feto do grupo controle com falanges normais (A). Feto do 104

grupo EAFCi com esternébrio em borboleta (B).

Figura 26: Feto do grupo controle com as vertebrae caudais normais (A). Feto do grupo EAFCi com agenesia de vértebras caudais (B). 105

Figura 27: Feto do grupo controle com costelas normais (A). Feto do grupo EAFCi com costelas onduladas (B). 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Representatividade da família Chrysobalenaceae na mata atlântica	33
Tabela 2- Secções seriadas de Wilson de fetos de ratas Wistar	49
Tabela 3- Prospeção fitoquímica do extrato Aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> .	55
Tabela 4- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAF <i>Ci</i> 2000 mg/kg), por via oral, sobre os parâmetros hematológicos de camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas.	57
Tabela 5- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAF <i>Ci</i> 2000 mg/kg), por via oral, sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas.	58
Tabela 6- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAF <i>Ci</i> 2000 mg/kg), por via oral, sobre o peso absoluto e relativo de camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas.	58
Tabela 7- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAF <i>Ci</i> 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos camundongos <i>Mus musculus</i> machos tratados por 28 dias consecutivos.	66
Tabela 8- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAF <i>Ci</i> 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas tratadas por 28 dias consecutivos.	67
Tabela 9- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAF <i>Ci</i> 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos camundongos <i>Mus musculus</i> machos tratadas por 28 dias consecutivos.	69
Tabela 10- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAF <i>Ci</i> 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas tratadas por 28 dias consecutivos.	70
Tabela 11- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAF <i>Ci</i> 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre o peso absoluto (g) e relativo (%) dos órgãos de camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas tratados por 28 dias consecutivos.	73
Tabela 12- Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAF <i>Ci</i> 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre	74

o peso absoluto (g) e relativo (%) dos órgãos de camundongos *Mus musculus* fêmeas tratados por 28 dias consecutivos.

Tabela 13- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os percentuais do parênquima lobular e não lobular do fígado nas fêmeas dos grupos experimentais. 80

Tabela 14- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os percentuais do parênquima lobular e não lobular do fígado nos machos dos grupos experimentais. 81

Tabela 15- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre o diâmetro glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins das fêmeas dos grupos experimentais. 82

Tabela 16- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre o diâmetro glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins dos machos dos grupos experimentais. 83

Tabela 17- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre a massa absoluta (g) e relativa (%) dos órgão de ratas Wistar tratadas durante o período da embriogênese (1º ao 6º dia de prenhez). 87

Tabela 18- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/Kg), por via oral sobre a massa absoluta (g) e relativa (%) dos órgão de ratas Wistar tratados durante o período da embriogênese (6º ao 15º dia de prenhes). 93

Tabela 19- Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/Kg), por via oral sobre os parâmetros reprodutivos de ratas Wistar tratadas durante o período da organogênese (6º ao 15º dia de prenhes). 95

Tabela 20: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre os parâmetros reprodutivos de ratas Wistar tratadas durante o período da organogênese (6º ao 15º dia de prenhez). 97

Tabela 21: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre as medidas das áreas (µm²) total do disco placentário dos animais dos grupos experimentais 99

Tabela 22: Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre as medidas das áreas (μm^2) das camadas do disco placentário dos animais dos grupos experimentais.	100
Tabela 23: Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre a contagem dos elementos da região do labirinto do disco placentário dos animais dos grupos experimentais.	100
Tabela 24: Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre a contagem dos elementos da região do trofospôgio do disco placentário dos animais dos grupos experimentais.	101
Tabela 25: Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAFCi 100, 200 e 400 mg/Kg), por via oral sobre as malformações e anomalias externas e internas (esquelética e visceral) da prole de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia).	103
Tabela 26: Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre as alterações esqueléticas da prole de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia).	106
Tabela 27: Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre os pontos de ossificação da prole de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia).	107

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT: alanina aminotransferase

ALP: Fosfatase alcalina

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST: aspartato aminotransferase

C. icaco: *Chrysobalanus icaco*

CCD: Cromatografia em camada delgada

CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

DL₅₀: Dose letal de uma substância capaz de matar 50% da população em estudo

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FDA: *Food and Drug Administration*

HCM: Hemoglobina Corpuscular Média

HCT: Hematócrito

i.p.: intraperitoneal

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NOAEL: Nível de efeito adverso não observado

OMS: Organização Mundial da Saúde

OECD: *Organization for economic cooperation and development - Guideline*

RDH: Amplitude da Distribuição das Hemácias

SnCl₂: Cloreto de estanho

VCM: Volume Corpuscular Médio

VPM: Volume Plaquetário Médio

v.o.: Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	20
2.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS	20
2.2 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS	21
2.2.1 Toxicidade Aguda	23
2.2.2 Toxicidade Subaguda	24
2.2.3 Toxicidade Aguda e Subaguda de plantas medicinais	24
2.2.4 Toxicologia do desenvolvimento	26
2.3 FAMÍLIA CHRYSOBALANACEA	33
2.3.1 <i>Chrysobalanus icaco</i>	34
2.3.2 Atividade farmacológica de <i>Chrysobalanus icaco</i> L	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 GERAL	38
3.2 ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 MATERIAL VEGETAL	39
4.2 ANIMAIS	39
4.3 TOXICIDADE AGUDA	40
4.4 TOXICIDADE SUBAGUDA	41
4.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA	41
4.6 ANÁLISE HEMATOLÓGICA	41
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA	42
4.8 TOXICIDADE REPRODUTIVA	43
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	55
6.2 TOXICIDADE AGUDA	55
6.3 TOXICIDADE SUBAGUDA	61
6.4 TOXICIDADE REPRODUTIVA	84
6.4.1 Exposição no período de embriogênese	84
6.4.2 Exposição no período de organogênese	91

7 CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS	109
ANEXO A- FOLHA APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA	118

1 INTRODUÇÃO

Em todo mundo, as plantas medicinais vem sendo utilizadas empiricamente pela população. No Brasil, este consumo é ainda mais evidente devido à grande biodiversidade do país. Atualmente o uso de plantas medicinais não se restringe apenas às zonas rurais ou a regiões onde a assistência médica e farmacêutica é precária, essa prática é também adotada no ambiente urbano, como uma forma complementar aos medicamentos alopáticos (CAMPOS et al., 2016).

Inúmeros estudos vêm demonstrando a potencialidade e a eficácia das plantas medicinais no combate a diversas doenças, entretanto existem sérios problemas em relação ao uso indiscriminado de produtos de origem vegetal. O principal deles é o fato da população subestimar a toxicidade de plantas medicinais acreditando que não apresentam efeitos tóxicos ao organismo (FERREIRA-MACHADO et al., 2004; RODRIGUES, ALMEIDA, PIRES, 2010).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão governamental responsável pela padronização da fabricação de fitoterápicos em escala industrial, garantindo a segurança e eficácia desses produtos (BRASIL, 2011). Apesar do controle rigoroso na qualidade desses medicamentos naturais, é possível encontrar na literatura alguns exemplos de fitoterápicos com ação tóxica, como por exemplo *Symphytum officinale* (confrei), responsável por causar hepatite, elevação de enzimas hepáticas como o aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), além de afetar os níveis de bilirrubina, quando administrado oralmente, a Kava-Kava (*Piper methysticum*), quando utilizada por um período maior que 60 dias, capaz de provocar alterações gastrointestinais, falência renal e lesões hepáticas grave, e o algodoeiro (*Gossypium herbaceum*), causa toxicidade sistêmica quando utilizados em doses altas entre outros. (CORDEIRO et al., 2005, SILVEIRA et al, 2008; SANDINI, et al. 2013).

Mesmo com amplo uso popular, muitas espécies vegetais não possuem validação científica quanto às suas propriedades toxicológicas e farmacológicas, sendo necessário estudos não clínicos e clínicos que atestem a segurança de uso destas plantas. Neste contexto, inclui-se *Chrysobalanus*.

icaco Linnaeus, uma espécie pertencente à família Chrysobalanaceae que se distribui nas regiões tropicais e subtropicais, e compreende cerca de 17 gêneros e 450 espécies de hábitos arbóreo e arbustivo, sendo caracterizada pela presença de flavonoides, triterpenos, diterpenos, esteroides e taninos (CHAUDHURI, 2002; BRACA 2002; CASTILHO, 2005; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Essa família é bastante representativa no Brasil pelo fato de suas espécies apresentarem diversas atividades biológicas. Dentre as espécies mais estudadas destaca-se a *C. icaco*, popularmente conhecida por guajerú, guajuru, abajeru, bajuru, bajirú, ajuru. Esta espécie encontra-se distribuída nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pará, Ceará, Pernambuco, Maranhão, Bahia, Sergipe, Piauí e Amazonas (LORENZI, MATOS, 2002; SILVA, PEIXOTO, 2009).

Na literatura é possível encontrar utilidades relevantes da espécie *C. icaco*. Na América e na África as cascas são usadas para tingir e endurecer redes de pesca (FONSECA-KRUEL et al., 2006). Seus frutos são consumidos *in natura* no Brasil e no México eles utilizados na fabricação de doces em calda (UGENT; OCHOA, 2006). Suas propriedades biológicas também têm sido relatadas, devido sua ação adstringente, as folhas, cascas e raízes são utilizadas contra diarreias e leucorreias (AGRA et al., 2008). O extrato aquoso da entrecasca possui ação anti-inflamatória e antinociceptiva (ARAÚJO-FILHO, 2016; OLIVEIRA et al., 2014). Ferreira-Machado et al. (2004) demonstraram que o extrato aquoso das folhas de *C. icaco* apresenta um potencial genotóxico pela indução de alteração da topologia plasmodial. Além disso, o potencial antitumoral e antidiabético desta espécie já são amplamente descritos (BARBOSA et al., 2013; FERNANDES et al., 2003; FERREIRA-MACHADO et al., 2014; LORENZI; MATOS, 2002; WHITE et al., 2015).

Apesar da grande representatividade da *C. icaco*, existe uma escassez de informações na literatura acerca de seus efeitos toxicológicos, nesse contexto, o presente trabalho busca esclarecer esses possíveis efeitos toxicológicos agudo, subagudo e reprodutivo.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 USOS DE PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas para fins terapêuticos é uma das mais antigas práticas da civilização. Esta utilização não se restringe apenas as zonas rurais ou a regiões onde a assistência médica e farmacêutica é precária; é também adotada no ambiente urbano, como uma forma complementar aos medicamentos alopáticos (VEIGA-JÚNIOR, 2005).

Inúmeros estudos têm demonstrado a potencialidade e a eficácia das plantas medicinais no combate a diversas doenças. Estima-se que 75% das substâncias químicas extraídas de vegetais e indicadas para fins terapêuticos derivam de espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional. Este conhecimento atrelado a modernos equipamentos tem acelerado o processo de desenvolvimento de novos fármacos derivados de plantas (RANGEL; BRAGANÇA, 2009; SAKLANI ; KUTTY, 2008).

O Brasil detém um terço da flora mundial e a maior reserva do planeta de produtos naturais com ação fitoterápica, e com isso a oportunidade de estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio na área da saúde e uso de plantas medicinais e fitoterápicas. Contudo das 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas no país, apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SANTOS et al., 2011)

No ano de 1978, a Organização Mundial da saúde (OMS) passou a reconhecer o uso de fitoterápicos para profilaxia e tratamento de doenças, graças à aceitação da fitoterapia pelos profissionais de saúde que atuam na atenção básica à saúde e ao aumento do uso pela população, onde cerca de 80% da população mundial, principalmente dos países em desenvolvimento, utilizam produtos à base de planta para o tratamento de diversas doenças. O principal problema da fitoterapia é a escassa documentação científica e comprovação dos resultados mediante protocolos de estudos padronizados e reconhecidos. Diante dessa perspectiva, a OMS elaborou uma serie de guias e

protocolos com o objetivo de definir as metodologias e avaliação da medicina tradicional (SANTOS, et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

Um grave problema inerente aos medicamentos naturais é o fato da população subestimar sua toxicidade, pois acreditam que estes são “inócuos” ao organismo. Entretanto, mesmo aqueles que possuem baixa toxicidade podem causar sérios danos à saúde, quando administrados em paralelo com outros medicamentos (sintéticos ou naturais) ou até mesmo pelo seu uso prolongado (BALBIN; DIAS, 2010; DOS REIS; DE SOUZA, 2006; MACENA, 2012).

Diante dessa problemática, vários países têm preconizado, por meio das agências regulamentadoras, a realização de estudos que comprovem e garantam a segurança e eficácia das plantas medicinais candidatas a fitoterápicos (SAHOO et al., 2010). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão governamental brasileiro responsável pela padronização da fabricação de fitoterápicos em escala industrial. No intuito de padronizar a fabricação de medicamentos fitoterápicos nas indústrias, a ANVISA publicou um formulário nacional de fitoterápicos em 2011. Nesse formulário estão as instruções sobre a forma correta de preparo, as indicações e restrições de cada espécie, além dos requisitos de qualidade que estão definidos em forma específica para a farmácia de manipulação e a farmácia viva (BRASIL, 2011).

As mudanças de pensamento social e ecológico são a constatação da potencialidade do uso das plantas medicinais. Com o pensamento sobre o desenvolvimento social e econômico baseado nos recursos renováveis, novos conhecimentos e novas necessidades buscaram no reino vegetal soluções para a descoberta de novas moléculas com atividade terapêutica para aplicação tanto na indústria farmacêutica quanto no desenvolvimento de fitoterápicos (SCHENKEL et al., 2003).

2.2 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

A Toxicologia é uma ciência que tem como objetivo estudar os efeitos nocivos provocados por um agente tóxico aos sistemas biológicos. Por meio de ensaios toxicológicos, ela avalia as modificações que ocorrem no

organismo vivo quando expostos, em condições propícias, a uma dada substância. Essas alterações podem ser reversíveis ou não, com efeito molecular, celular ou tecidual e até levar à morte do indivíduo (TAHRAOUI, 2010; VALADARES, 2006).

As plantas medicinais parecem não ser 100% seguras como parece, existem várias substâncias oriundas do reino vegetal que apresentam elevada toxicidade, por exemplo, os alcaloides pirrolizidínicos encontrados no Confrei (SANDINI, et al., 2013). Vale salientar que o potencial tóxico de uma substância química depende da dose, da via de administração e do tempo de exposição. Sua toxicidade pode ser avaliada pelo consumo alimentar, mudanças no comportamento, peso ponderal, análise macroscópica dos órgãos e histologia dos tecidos. As análises hematológicas e bioquímicas também são de extrema importância, pois fornecem informações relevantes de como a substância teste influencia na homeostase e nos parâmetros hepáticos e renais. Para serem consideradas seguras, as condições de exposição devem estar abaixo dos níveis de tolerância (OECD, 2001).

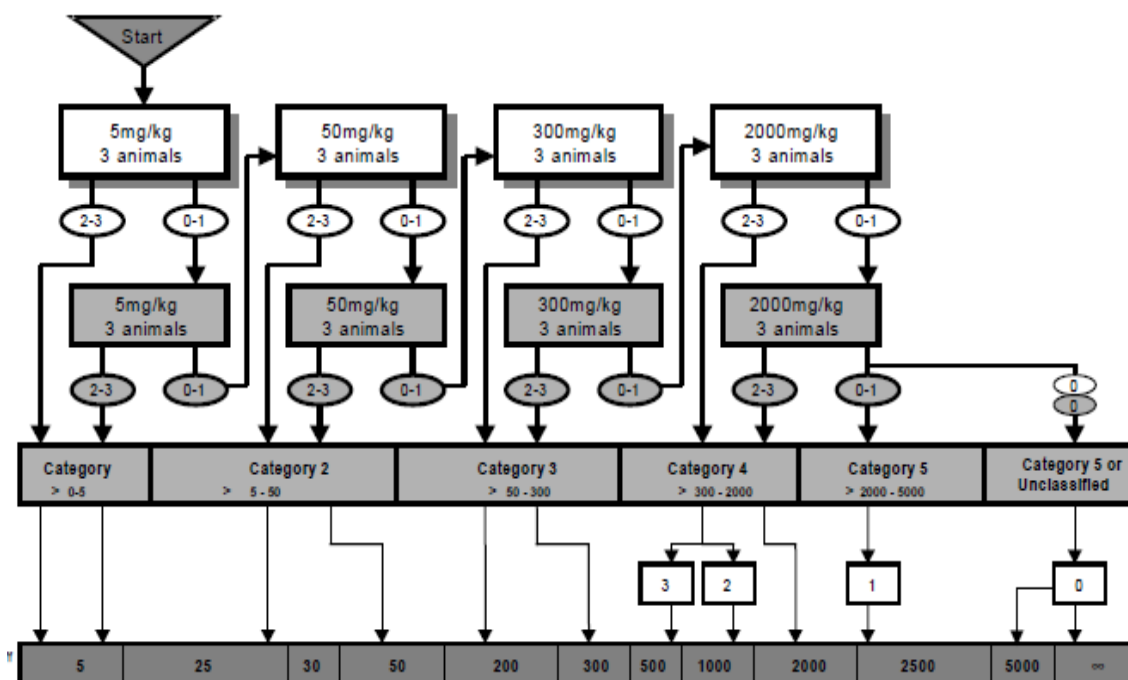
A execução dos testes toxicológicos deve ser feita segundo os protocolos aceitos pela comunidade científica. Mundialmente são aceitos o da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), da *Food and Drug Administration* (FDA) e do ministério da Saúde do Japão. No Brasil, a regulamentação desses testes é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2013; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Esses testes são necessários para assegurar a eficácia das plantas medicinais (FERNANDES, 2016)

A toxicidade sistêmica é dividida em dois parâmetros, os ensaios de dose única e os de exposição repetida que são realizados em animais de laboratório sob condições adequadas, onde a escolha da espécie, via de administração e dose são fundamentais para o sucesso do teste além de ter aplicabilidade para espécie humana, uma vez que a obtenção de dados toxicológicos em seres humanos é bastante limitada, pois esbarram nos princípios legais, morais e éticos (VALADARES, 2006).

2.2.1 Toxicidade Aguda

O ensaio de toxicidade aguda é a etapa inicial para investigar o potencial tóxico sistêmico de uma substância administrada em única dose. Este teste pode sugerir a escolha da dose para os testes de toxicidades adicionais e fornecer informações relevantes sobre os riscos que essa substância pode causar à saúde animal e humana (BRIGHETTI, 2004). O principal objetivo do teste não é calcular a dose letal mediana (DL_{50}), que representa a dose capaz de matar metade dos animais em estudo, e sim obter informações suficientes para permitir a classificação de acordo com o grau de toxicidade ou letalidade da substância. Para realização do teste, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD) recomenda que sejam utilizados camundongos ou ratos fêmeas e um número de três animais em cada etapa do experimento, onde a ausência ou presença de morte dos animais tratados determinará a necessidade de etapas seguintes (Figura 1). Além disso, a administração oral é a mais aconselhada, e a dose limite de 2000 mg/Kg é suficiente para estimar a DL_{50} (OECD, 2001).

Figura 1: Orientação para testes de produtos químicos- Toxicidade oral aguda



Fonte: OECD, 2001 adaptado.

Várias informações podem ser obtidas a partir da avaliação da toxicidade sistêmica aguda, como o potencial tóxico em um órgão específico, a relação dose resposta e indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica. Por isso, o estudo da toxicidade aguda oral é fundamental para avaliar a segurança de drogas vegetais e fitoterápicas (CUNHA et al, 2009; VALADARES, 2006).

2.2.2 Toxicidade subaguda

O estudo toxicológico de doses repetidas fornece informações sobre a toxicidade de um produto quando administrado diariamente durante 28 dias. Seu principal objetivo é estabelecer em quais níveis de doses a droga não causa toxicidade, além de identificar os órgãos afetados e o grau de comprometimento do mesmo (TAHRAOUI et al., 2010).

De acordo com as orientações da OECD, para realização do teste, é aconselhável a utilização de ratos, entretanto, outras espécies de roedores podem ser usadas. Na tentativa de mostrar diferenças na gradação dos efeitos tóxicos, devem ser empregadas três doses suficientemente espaçadas com a dose limite de 1000 mg/kg/dia e cada grupo terá que ser composto por um número de dez animais (5 machos e 5 fêmeas). As substâncias em estudo devem ser administradas via oral, que pode ser por gavagem, na dieta ou na água de beber, onde o método de administração vai depender das características químicas e físicas do produto teste (OECD, 2008).

Os animais são observados todos os dias quanto a alterações no consumo de água e ração, massa corpórea, parâmetros respiratórios e cardiovasculares, mudanças comportamentais e anormalidades motoras. Ao final do experimento, os animais são anestesiados e amostras sanguíneas são coletadas para realização de exames hematológicos e bioquímicos. Adicionalmente, os principais órgãos são retirados para avaliação macroscópica e histopatológica (OECD, 2008).

2.2.3 Toxicidade aguda e subaguda de plantas medicinais

A crença de que produtos naturais não fazem mal a saúde faz com que a toxicidade deles seja por muitas vezes subestimadas. Experimentos clínicos

e não clínicos tem demonstrado que a utilização de algumas espécies de plantas causa inúmeros efeitos adversos ao organismo (FERNANDES, 2016).

Um estudo realizado em ratos *Rattus norvegicus* (machos e fêmeas), mostrou que a administração de 10 mg/Kg do extrato aquoso de *Allium sativum* (alho) durante 30 dias, aumenta o peso do coração, fígado e rins e a concentração sérica do AST dos animais tratados em relação ao grupo controle (SULAIMAN, 2014).

CUNHA et al. (2009) observaram que o látex de *Synadenium umbellatu*, uma planta usada tradicionalmente pela população como antitumoral e anti-inflamatória, pode ocasionar congestão e infiltrado leucocitário nos rins, fígado e pulmões quando administrado em doses repetidas.

A administração única via intraperitoneal, do extrato etanólico de *Trifolium pratense* (trevo vermelho) altera a respiração, ocasiona falta de coordenação motora e leva ao óbito os animais tratados com dose acima de 4500 mg/kg (BARIKEL et al., 2002).

O tratamento agudo com o óleo de *Ocimum gratissimum* (manjerição), por via oral, em doses superiores a 0,27g/Kg, manifesta sinais de toxicidade e óbitos em camundongos tratados. O mesmo estudo mostrou que os ratos tratados por 30 dias (via intraperitoneal) com o mesmo óleo apresentam sinais de toxicidade, óbito e alterações de órgão vitais na utilização de doses acima de 80 mg/Kg.

Também é possível encontrar na literatura relatos de medicamentos obtidos de plantas com efeito tóxico, como a Kava-Kava (*Piper methysticum*), uma planta utilizada na fabricação de um fitoterápico indicado para o tratamento de angústia, insônia e ansiedade. É considerado um ansiolítico natural e suas propriedades também servem como relaxante muscular, em casos de tensão. Entretanto, se usada de forma prolongada e em excesso, pode provocar casos de insuficiência hepática grave (CORDEIRO et al., 2005).

Symphytum officinale (confrei) é outro exemplo de medicamento fitoterápico com ação tóxica, essa planta é usada desde a antiguidade para o tratamento da consolidação de fraturas. Recentemente foram relatados casos

de intoxicação em humanos e animais que consumiram a planta e desenvolveram lesões hepáticas graves que foram associadas à presença de alcalóides pirrolizidínicos encontrados em folhas frescas, raízes e preparações comerciais na forma de cápsulas e pílulas. Tais fatos levaram à proibição do uso interno do confrei nos Estados Unidos e no Canadá. No Brasil, a partir do ano de 1992 apenas produtos para aplicação tópica continuam liberados (BRASIL, 1992; SANDINI, 2013).

Ao avaliarem a segurança da “Tintura de Algodoeiro®”, um fitoterápico constituído de extrato fluído de *Gossypium herbaceum* (algodoeiro) e indicado contra inflamações, hemorragias menstruais, amenorreia, dismenorréia, impotência sexual e frigidez, Mello, et al. (2008) mostrou que os efeitos adversos ligados a toxicidade sistêmica (redução de massa corporal, ocorrência de óbitos e lesões histológicas) só ocorre em doses superiores a 5x a dose terapêutica (MELLO, et. al., 2008)

2.2.4 Toxicologia do desenvolvimento

A toxicologia do desenvolvimento engloba a teratologia e a toxicologia da reprodução. A teratologia se encarrega de estudar as alterações que foram induzidas entre a concepção e o nascimento, enquanto a toxicologia reprodutiva investiga os efeitos adversos causados no sistema reprodutor masculino e feminino após exposição a um agente químico (MOORE; PERSAUD, 2008).

✓ Teratologia

Teratologia é a ciência que estuda os defeitos ligados a uma perturbação do desenvolvimento embrionário ou fetal, que podem ser iniciados em qualquer período entre a fertilização e desenvolvimento pós-natal. Alguns estágios de desenvolvimento embrionário são mais críticos e vulneráveis a essas perturbações (MOORE; PERSAUD, 2008). Esses defeitos podem ser rupturas, deformidades, malformações ou displasias (HANSEN; YANKOWITZ, 2002). A ação de um agente teratogênico sobre o organismo materno, embrionário e fetal, pode levar a perda da gestação, malformações físicas, funcionais e comportamentais (BERNARDI, 1999; KALTER, 2003).

Teratógeno é qualquer substância, organismo, agente físico, químico, ambiental, ou estado de deficiência, presente durante a vida embrionária ou fetal, capaz de produzir alterações estruturais ou funcionais na descendência. Entre os fatores ambientais estão os agentes infecciosos, como o vírus da rubéola, citomegalovírus e o parasita *Toxoplasma gondii*; os agentes físicos, como radiação; os agentes químicos, como mercúrio, chumbo e fármacos, como atalidomida, ácido retinóico, ácido valpróico e o misoprostol (FAVERO, 2006).

Até o ano de 1940, acreditava-se que os embriões dos humanos estavam protegidos pelas membranas extraembrionárias/fetais (âminio e cório) e pela parede do útero materno de quaisquer agentes ambientais como os vírus e drogas. Entretanto em 1941, foram documentados os primeiros relatos que o embrião podia ser afetado por fatores ambientais. Foi observado um grande número de casos de catarata e outras anomalias em recém-nascidos cujas mães haviam contraído rubéola no início da gestação. Duas décadas depois, começou a epidemia da talidomida, um sedativo popular prescrito para mulheres grávidas para o alívio de enjoos matinais. Milhares de crianças malformadas nasceram de mulheres que ingeriram esse medicamento durante a gestação. Os fetos expostos à talidomida apresentaram intestinos malformados, defeitos na audição, ausência de orelhas, anomalias renais e oculares. Porém, o fenótipo que mais chamou a atenção foi ameromelia-focomelia, uma síndrome caracterizada pela aproximação ou encurtamentos dos membros ao tronco do feto. Atualmente a talidomida é totalmente contra indicada para mulheres em idade fértil, pois se for usada entre o 24º e 36º dia após a fertilização causa anomalias congênitas fetais (MOORE; PERSAUD, 2008; SMITHELLS; NEWMAN, 1992).

As causas de defeito no nascimento ou anomalias congênitas podem ser divididas nos seguintes tipos: decorrentes de fatores genéticos, como anormalidades cromossômicas; e fatores ambientais, como vírus e drogas. No entanto, existem algumas anomalias congênitas que são causadas por fatores genéticos e ambientais (herança multifatorial). As causas mais comuns de fatores genéticos são as anomalias congênitas, acredita-se que um terço de

todos os defeitos ao nascimento são causados por ela (MOORE; PERSAUD, 2008).

Desde a década de 1930, o rato tem sido utilizado experimentalmente em estudos de fisiologia reprodutiva e endocrinologia, devido às similaridades encontradas entre as gestações de ratos e de seres humanos e estas, não são compartilhadas por todas as espécies de mamíferos, o que favorece o uso do mesmo como modelo animal, tanto para estudos sobre controle endócrino da função reprodutiva e do desenvolvimento, como também avaliação dos efeitos tóxicos de substâncias (GRAY et al., 2004).

No período gestacional ocorrem várias mudanças no sistema neuroendócrino com o objetivo de manter a saúde materna e oferecer condições ideais para o desenvolvimento do feto. Inúmeros processos adaptativos e modificações hormonais acontecem, o que garante o sucesso da gestação (MOORE; PERSAUD, 2008; NOGUEIRA e LIBERMAN, 2002). Esse período pode ser dividido em três fases: pré-implantação, organogênese e fetal (FRITZ; GIESE, 1990).

A primeira fase corresponde ao período de pré-implantação que vai desde a fecundação até a implantação do blastocisto no útero. Nas mulheres e nos ratos, o intervalo entre o coito e a implantação tem duração de quatro a seis dias, outros mamíferos como o cachorro, a ovelha e o cavalo, apresentam um tempo entre coito e implantação muito mais longo. Nos humanos, a primeira fase se estende até o 17º dia pós-fecundação, enquanto nos ratos e camundongos até o 6º dia. Essa fase inicial da gestação é de extrema importância, pois durante esse período a exposição materna a produtos tóxicos pode interferir no desenvolvimento do embrião e também causar sua morte (BRENT et al. 1993; WILSON et al. 1965; WILSON; FRASER, 1977).

Quando ocorre a implantação do blastocisto no útero se inicia o período da organogênese, na espécie humana vai do 18º ao 57º dia de gestação, e no rato, do 7º ao 15º. Esse período é caracterizado por uma intensa proliferação e migração celular, remodelamento tissular e formação rudimentar das estruturas do corpo (BRENT, 1993). Em ratos e em seres humanos, ocorre a ruptura do epitélio uterino e invasão do estroma endometrial pelo blastocisto que

acarretana formação da placenta hemocorial, caracterizada pela íntima relação entre as circulações materna e fetal. Para dar suporte à implantação e ao desenvolvimento do embrião, o endométrio de humanos e de camundongos passa por uma série de modificações conhecida em conjunto como decidualização que é caracterizada por uma pronunciada reação estroma-endométria, resultado na formação da decídua (componente maternal da placenta). Em contrapartida, na ovelha, na égua e na vaca, a placenta é epiteliocorial (não invasiva) e a relação feto-maternal é menos íntima (ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993; GRAY et al., 2004; RASWEILER IV; BADWAIK, 1999; WITORSCH, 2002). A placenta é extremamente importante em estudos que busquem analisar os riscos de uma substância embriofetotóxica, pois se localiza entre a mãe e o feto e é responsável pela troca de substância entre eles. Ela atua como uma barreira seletiva e pode funcionar também como um reservatório para as drogas que conseguem atravessá-la e estas podem causar redução do fluxo sanguíneo, necrose placentária ou inibição da passagem de nutrientes pela placenta (SILVA et al., 2009). É o período de maior susceptibilidade à ação de agentes teratogênicos e embriofetotóxicos, sendo considerado o período teratogênico clássico (BRENT, 1993).

Ao final do período da organogênese, inicia-se a terceira fase, denominada fase fetal, que nos humanos abrange o período que vai desde o 57º dia pós-fertilização até o nascimento, e no rato do 16º até o 21º dia. Essa fase é caracterizada por diferenciação e crescimento tecidual, maturação fisiológica dos diferentes sistemas e crescimento ponderal do feto (FRITZ; GIESE, 1990; MOORE; PERSAUD, 2008). Nessa etapa, a sensibilidade frente a agentes tóxicos é extremamente baixa, porém ainda pode-se provocar morte celular e inibição da diferenciação e divisão celular, o que pode interferir na maturação do sistema imunológico, nervoso e endócrino (AUROUX, 1997). Nesse período é possível observar uma diminuição relativa da cabeça em relação ao corpo e uma elevada taxa de crescimento, principalmente nas últimas semanas (MOORE; PERSAUD, 2008).

✓ Toxicidade Reprodutiva

A toxicologia reprodutiva está relacionada com a teratologia e investiga os efeitos adversos na capacidade reprodutiva de um organismo e no desenvolvimento da prole (BARROS E DAVINO, 2003). Os efeitos adversos incluem alterações no sistema reprodutivo, maturação sexual, comprometimento de acasalamento, alteração da função endócrina, produção e transporte de gameta, ciclo reprodutivo, fertilidade e incidência de partos prematuros. Os efeitos adversos nas proles incluem aqueles ocorridos antes ou depois do nascimento, estes efeitos podem ser manifestados em qualquer momento de vida do organismo e inclui morte, anormalidade estrutural, alteração de crescimento e deficiência funcional (OECD, 2015).

Para avaliar a toxicidade causada por uma substância química, são levados em consideração vários fatores que podem interferir na resposta ao agente exposto, tais como a dose administrada, o tempo de administração, tempo da gestação e, sobretudo a sensibilidade que cada indivíduo tem ao produto. Com isso, é necessário estabelecer protocolos experimentais apropriados (ALMEIDA; LEMÔNICA, 2001; OECD, 2015).

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) a investigação da toxicidade do desenvolvimento pode se dividida em três seguimentos, que estão descritos abaixo.

a) Segmento I – compreendem os estudos que avaliam os efeitos sobre a fertilidade e o desempenho reprodutivo, formação e maturação espermática e acasalamento, tanto de machos quanto de fêmeas. Os machos são tratados antes e durante o acasalamento, e após o cruzamento eles são eutanasiados para análise do órgão reprodutivo, enquanto as fêmeas são tratadas antes do acasalamento e durante a prenhez e lactação. Após a gestação, uma parte das fêmeas é submetida à cesariana e os fetos são avaliados quanto à presença de malformação visceral e esquelética, outra parte prossegue para o parto normal, e o tratamento com a substância teste continua até o período de lactação;

b) Segmento II - Avalia as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie exposta durante a fase da organogênese; as fêmeas são tratadas do 6º ao 15º dia de gestação ou 20º dia. No 21º dia, é realizada uma cesariana e os fetos são avaliados quanto à presença de malformações externa e anomalias viscerais e esqueléticas.

c) Segmento III – Investiga os efeitos sobre o desenvolvimento pré- e pós-natal de progênes expostas durante a fase de desenvolvimento fetal e lactação. O tratamento tem início no 15º dia de gestação e se estende até o 21º pós-natal. São analisados problemas durante o trabalho de parto, sobrevivência no período neonatal e o desenvolvimento somático e neurocomportamental durante o período pós-natal.

Os ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, são os mais utilizados nos testes de toxicidade reprodutiva e teratogenicidade. Contudo, a legislação recomenda que sejam realizados em, pelo menos, duas espécies animais (HOLLENBACH, 2008; MELLO; LANGELOH, 2006). A via oral é a mais utilizada nesses ensaios, pois permitem determinar a dosagem precisa da substância estudada e padronizar os níveis plasmáticos maternos. Outras vias de administração podem ser empregadas de acordo com a exposição e características físico-químicas da substância em análise (LEMÔNICA, 2003; OECD, 2015).

✓ Toxicologia do desenvolvimento e plantas medicinais

As espécies vegetais utilizadas para fins terapêuticos podem apresentar efeitos adversos e gerar transtorno para gestantes. Por isso, seu uso deve seguir um controle rigoroso, da mesma forma que é feito com os medicamentos alopáticos, uma vez que alguns desses produtos de origem vegetal possuem uma grande complexidade química, sendo possível que parte de seus constituintes não tenham sido identificados e não existam informações sobre seus efeitos no organismo. O principal problema do consumo de plantas medicinais no período gestacional é a escassez de informações na literatura acerca dos efeitos embiotóxicos, teratogênico e abortivo (RODRIGUES et al., 2011; SÁ, 2014.).

O estudo realizado por Almeida e Lemônica (2000) mostrou que o extrato hidroalcoólico de *Coleus barbatus* B., popularmente chamado de falso boldo, causa um atraso no desenvolvimento fetal e efeito anti-implantação quando administrado na dose de 880 mg/kg/dia durante os períodos de pré-implantação e organogênese. Em outro estudo, foi observado que a exposição durante o período organogênico a *Artemisia vulgaris* L. causa um aumento nas taxas de reabsorções por implantação na dose de 6000 mg/kg/dia. (CALLIARI-MARTIN et al. 2001).

O extrato aquoso das folhas da arruda (*Ruta graveolens* L) causa efeitos embriotóxicos e teratogênicos quando administrado na dose de 10 mg/kg/dia no período pós-implantação em camundongos prenhes (GONZALES et al., 2006).

A angélica (*Angelica archangelica*), sucubá (*Himanthus sucuba*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), arnica (*Arnica montana*), cânfora (*Cinnamomum canphora*), confrei (*Symphytum officinale* L.), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e sene (*Cassia angustifolia* e *Cassia acutifolia*), são exemplos de plantas medicinais com ação abortiva, pois podem estimular a motilidade uterina e provocar o aborto (VEIGA JUNIOR, et al., 2005).

O extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi* apresenta um efeito tóxico sobre o sistema reprodutivo de ratas Wistar. Quando administradas nas doses de 1,22; 6,1 e 30,5 mg/kg/dia durante a fase de pré implantação, provoca diminuição no números de implantes uterinos seguido de perdas pré-implante. Além disso, foi observado que nas doses mais elevadas (6,1 e 30,5 mg/kg/dia) ocorre um aumento no número de reabsorções de embrião (ROCHA et al. 2013).

Soares et al. (2015) mostraram que o tratamento com extrato etanólico da casca de *Himatanthus sucuba* entre o 1º e 14º dias pós-implantação, na dose de 250 mg/kg, causa um aumento nas perdas pré-implante e no peso placentário, além de diminuir a eficiência placentária quando comparados ao grupo controle. Adicionalmente, foi visto que a dose de 500 mg/kg é responsável por diminuir significativamente a eficácia placentária e o peso corporal materno e fetal, além de provocar um aumento de perdas pré-implante (SOARES et al, 2015).

Estudos na área de toxicologia reprodutiva envolvendo diferentes doses, formas de preparo e partes da planta, são fundamentais para estabelecer doses seguras, e com isso explorar os efeitos benéficos dos constituintes ativos em cada espécie vegetal de interesse.

2.3 FAMÍLIA CHRYSOBALANACEA

A família Chrysobalanaceae é composta por 17 gêneros e aproximadamente 525 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. Já foram identificados 167 metabólitos secundários em diferentes espécies, sendo os principais constituintes químicos esteroides, taninos, flavonoides, triterpenos e diterpenos. A floresta amazônica abriga o maior número de espécies de Chrysobalanaceae da América do Sul. Na mata atlântica são encontradas 45 espécies endêmicas (Tabela1) (HEMSING E ROMERO, 2010; NETO et al., 2013).

Tabela 1: Representatividade da família Chrysobalanaceae na mata atlântica

Gênero	Número de espécies			
	Mundo	Brasil	Mata Atlântica	
			Total	Endêmicas
<i>Chrysobalanus</i>	3	1	1	0
<i>Couepia</i>	71	57	16	16
<i>Exellodendron</i>	5	6	2	1
<i>Hirtella</i>	107	62	14	9
<i>Licania</i>	214	110	21	15
<i>Parinari</i>	39	12	5	4
Total			59	45

Fonte: Aguiar, 2010

A família Chrysobalanaceae apresenta um importante valor econômico, relacionado com o consumo da fruta, carvão mineral e é utilizada na medicina popular para o tratamento de várias doenças como malária, diarreia, infecções e diabetes. Os estudos fitoquímicos e farmacológicos comprovam a eficácia e o largo potencial terapêutico de algumas espécies de Chrysobalanaceae, sendo

os gêneros *Chrysobalanus*, *Couepia*, *Licania* e *Paranarium* os mais estudados (FEITOSA et al.; 2012).

2.3.1 *Chrysobalanus icaco*

Popularmente conhecida como abajuru, bajurur, ajiru, ajuru, cajuru, goajuru, guajeru, guajuru entre outros. Naturalizou-se na Ásia (Índia e Vietnã) e nas ilhas do pacífico, mas é originária tanto da América quanto da África. No continente africano ela é encontrada desde a Guiné até Angola, Tanzânia, Camarões, Senegal e Trinidad e Tobago. Já na América se distribui desde a Flórida até o Sul do Brasil e no litoral da Colômbia e do Equador (SMITH et al., 2004; VARGAS et al., 2000). É possível encontrar a espécie *C. icaco* em todo território brasileiro, ocorrendo principalmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Piauí, Ceará e Pernambuco (SILVA, PEIXOTO, 2009).

C. icaco é uma planta arbustiva (Figura 2a), de porte médio e pode atingir até 4 metros de altura, seu caule é tortuoso de casca fina ou reticulada com coloração cinza esbranquiçada. As folhas são arredondadas ou ovais, com uma textura grossa e flexível e coloração verde escuro (Figura 2b), utilizadas em forma de chá (extrato aquoso) e para tintura (extrato etanólico). Um estudo revelou que as folhas de *C. icaco* contém uma alta concentração de fibra alimentar total e baixa concentração de lipídios, além de serem ricas em cálcio, magnésio, ferro, manganês, cromo e selênio (AGUIAR, 2010). As flores são brancas ou verdes e nascem nos ramos auxiliares (Figura 2c).

O fruto é do tipo drupa arredondado ou ovoidede coloração variada (Figura 2d), com polpa branca adocicada e no período de maturação bastante adstringente são extremamente ricos em antocianinas, que confere ao fruto uma propriedade antioxidante, além de serem fontes de sais minerais como o ferro, cálcio, selênio, cobre e cromo (AGUIAR, 2010). O fruto é consumido “*in natura*” pelas populações ribeirinhas no Brasil, com pouca importância econômica para o país, já em Cuba e no México são utilizados em escala industrial na fabricação de doces e conservas (ESPINOSA-OSORNIO, 2002; SANTANA; SILVA, 2000).

Figura 2: Exemplar de *Chrysobalanus icaco*. A) Arbusto; B) Folha; C) Flores e D) Fruto.



Fonte: <http://www.florestaaguadonorte.com.br/galeria-da-pagina-inicial/fruta-da-amazonia/ajuru-rosa/>.

Estudos fitoquímicos revelaram alguns compostos químicos em *C. icaco*. Castilho et al. (2000) isolaram séries homologas de hidrocarbonetos de C27 e C33, de ácido pomólico, ácido betulínico, a partir do fracionamento cromatográfico das partições e do extrato metanólico das folhas de *C. icaco*. A presença de Miricetina foi confirmada no extrato etanólico das folhas de *C. icaco*, sendo esta um provável marcador taxonômico para a espécie (BARBOSA et al, 2006; FERNANDES et al, 2003; MENDEZ et al, 1995). O extrato aquoso das folhas de *C. icaco* contém rutina (Barbosa; Peres, 2002), taninos flobafênicos, flavonas, chalconas, catequinas, saponinas, alcaloides e auronas (WHITE, 2010). Um estudo realizado com o extrato hidroalcoólico de *C. icaco*, detectou a presença de quercitrina, rutina e miricetina-3-glicuronídeo-O (miricitrina, como constituinte majoritário), além de outros derivados menores de miricetina (BARBOSA e PERES, 2002; BARBOSA et al, 2006).

2.3.2 Atividades farmacológicas de *Chrysobalanus icaco*

C. icaco é utilizada para diversos fins, dentre eles, como corante, no artesanato, como alimento e na medicina popular onde se destaca pela sua propriedade hipoglicemiante. As raízes, cascas, folhas e flores são indicadas para curar doenças como disenteria, leucorréia, infecções viscerais, diabetes e inflamação, além de serem usadas como anestésico e diurético.

A atividade citotóxica foi comprovada por Fernandes et al. (2003), eles observaram que o ácido pomólico, extraído a partir das folhas de *C. icaco*, inibiu o crescimento e induziu a apoptose em linhagens de células de eritroleucemia (K562). Além disso, esse triterpeno foi capaz de diminuir o crescimento da linhagem Lucena 1, uma linhagem tumoral resistente a múltiplas drogas (FERNANDES, 2003). O extrato metanólico das folhas de *C. icaco* inibe o crescimento de células de HeLa, uma linhagem de células imortal oriunda do câncer cervical, em altas concentrações (100 e 200 µg/mL) e causam modificação no perfil proteico após 48h de incubação (CASTILHO, 2000). As antocianinas presente nos frutos de *C. icaco* possuem atividade anticancer e anti-inflamatória, pois reduzem a proliferação celular e diminuem a expressão dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NF- κ B em células cancerígenas de colón humano HT-29 (VENÂNCIO et al., 2015).

Oliveira et al. (2014) demonstraram que a administração do extrato aquoso da entrecasca de *C. icaco* nas doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg reduz o edema de pata em ratos induzido por carregénina e dextrana, a permeabilidade vascular induzida por ácido acético e a migração celular no modelo de bolsa de ar subcutâneo, comprovando sua atividade anti-inflamatória. As doses de 200 e 400 mg/kg apresentaram efeito antinociceptivo uma vez que reduziu significativamente as contorções abdominais induzidas por ácido acético. Essa atividade também foi comprovada por Araújo-Filho et al. (2016), eles observaram que o pré-tratamento agudo com o extrato aquoso das folhas de *C. icaco* nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg, v.o., apresenta atividade antinociceptiva quando comparado ao grupo controle no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. No teste de formalina, o extrato aquoso das folhas de *C. icaco* foi efetivo na segunda fase (ARAÚJO-FILHO et al., 2016).

Ao analisar os efeitos toxicológicos do extrato aquoso das folhas de *C. icaco*, foi observado que o mesmo demonstra um potencial genotóxico pela indução de alteração da topologia plasmoidal, apresentando também ação antioxidante (FERREIRA-MACHADO, et al., 2004; FERREIRA-MACHADO, et al., 2013; PRESTA, et al., 2007).

O potencial antiangiogênico do extrato metanólico obtido das folhas de *C. icaco* foi observado através da redução de aproximadamente 44% na formação de novos vasos sanguíneos em membrana corioalantóide de galinha (ALVES *et al*, 2000). A atividade antimicrobiana *in vitro* foi relatada por Castilho (2011), por meio de ensaio de difusão em ágar mostraram que o extrato bruto em metanol e hexanosão eficientes contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (CASTILHO, et. al., 2011).

O primeiro estudo que faz referência à utilização do chá de *Chrysobalanus icaco* em animais diabéticos foi realizado por Pereira (1987), eles observaram que o chá a 5% bloqueou a absorção intestinal de glicose em 64,2% e a redução da glicemia em jejum (PRESTA, 1987). A ingestão de *C. icaco* reduz significativamente os valores de glicemia e triglicerídeos em animais diabéticos e mantêm a homeostase da glicose, pois normaliza a sensibilidade à insulina e tolerância a glicose em camundongos obesos (BARBOSA et al., 2013; FERREIRA-MACHADO et al., 2013; WHITE et al., 2016)

Recentemente foi descoberto que o extrato aquoso das folhas de *C. icaco* possui efeitos metabólicos benéficos em ratos obesos induzidos por dieta, quando administrados em baixas doses promove uma diminuição no ganho de peso, nos níveis de triglicerídeos e na excreção fecal de lipídios, além de aumentar o peso da massa magra e da atividade motora desses animais. A dose de 200mg/kg administrada na água de beber durante quatro semanas inibe o ganho de peso e o armazenamento de gordura no fígado de camundongos submetidos a uma dieta hipercalórica (WHITE et al., 2016).

Apesar da grande representatividade da *Chrysobalanus icaco*, existe uma escassez de informações na literatura acerca de seus efeitos toxicológicos, diante disto, se fazem necessários estudos que visem compreender os possíveis efeitos toxicológicos desta espécie.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar em nível não clínico, a toxicidade aguda, subaguda e reprodutiva (período de embriogênese e organogênese) do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* Linnaeus (EAF*ci*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* Linnaeus (EAF*ci*);
- Investigar o efeito toxicológico agudo do EAF*ci* em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*);
- Avaliar a toxicidade subaguda (doses repetidas, 28 dias) em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*);
- Avaliar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos e morfométricos dos camundongos submetidos à toxicidade aguda e subaguda.
- Analisar o efeito da administração oral do EAF*ci* durante o período de embriogênese e organogênese em ratas Wistar;
- Avaliar as variáveis reprodutivas de ratas Wistar;
- Estudar a possível embriofetotoxicidade e teratogenicidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O material botânico foi coletado no município de Itamaracá, Pernambuco, em setembro de 2014. A identificação da espécie foi realizada pela Dra Leidiana Lima da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para obtenção do extrato aquoso, as folhas foram secas em estufa a 40 °C e trituradas. Em seguida, o pó (50 g) foi submetido à extração por infusão em água destilada (1000 mL) a 100 °C durante 15 min. Após este período, o extrato foi filtrado, concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida e seco em liofilizador. O protocolo foi repetido até se obter uma quantidade suficiente para realização do protocolo experimental. O extrato aquoso foi armazenado a 4 °C e solubilizado em solução salina nas concentrações desejadas minutos antes da realização dos experimentos.

A análise do perfil fitoquímico foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), segundo Wagner e Bladt (2001). O extrato aquoso das folhas de *C. icacoi* foi pesado e resuspenso em solventes para se obter uma concentração final de 5mg/mL. O sistema de solventes utilizado foi Hex/AcOEt/MeOH (3:5:2) v/v/v.

Após o desenvolvimento do sistema de solventes, as placas foram secas e pulverizadas com os reveladores específicos para a identificação dos compostos metabólicos: Dragendorff's (alcalóides), Liebermann-Burchard (terpenos e esteroides), cloreto de alumínio (flavonóides), cloreto férrico (taninos) e hidróxido de potássio (cumarinas e antraquinonas). Como desenvolvedores universais, anisaldeído e sulfato cérico foi usado. Os cromatogramas foram examinados sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e pulverizadas com reagente revelador para visualizar os compostos separados.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas e machos (60 dias e 30g - 35g), provenientes e mantidos no biotério setorial do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As ratas da linhagem Wistar (90 dias) foram provenientes e mantidas no biotério setorial do

Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE. Os animais receberam água e ração (LABINA Purina Brasil) “*ad libitum*” e foram mantidos em condições normais de temperatura (22 ± 2 °C) e umidade ($60 \pm 1\%$), sob ciclo natural claro e escuro de 12-12 horas. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE sob o número 23076.016550/2016-38 (Anexo A)

4.3 TOXICIDADE AGUDA

Para avaliação da toxicologia aguda foi utilizada a metodologia recomendada pela *Organization for Economic Cooperation and Development - Guideline 423* (OECD, 2001). Camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas (n=12) foram aleatoriamente distribuído em dois grupos, controle e tratado, de três animais cada. Uma dose única de 2000 mg/kg do EAF*Cl*, ressuspenso em água, foi administrada oralmente, por gavagem, aos animais do grupo teste. Os animais do grupo controle recebeu água (10 mL/kg). Os animais foram observados nas primeiras duas horas após a administração e diariamente durante 14 dias, essa avaliação foi realizada pelo método de *screening* hipocrático, que considera os critérios comportamentais excitatórios (agitação, convulsões, frêmito vocal, irritabilidade, movimentos estereotipados, resposta ao toque, salivação, taquicardia e tremores), inibitórios (contorção abdominal, estiramento, ptose, sonolência e trem posterior) e atividade geral como defecação, diarreia, lacrimejamento, micção piloereção e óbito. Além disso, o peso, o consumo de água e ração também foram avaliados durante todo o experimento.

No 14º dia, os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (2:1; v/v, i.p), a coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca, e a realização dos exames hematológicos e bioquímicos. O fígado, rim e baço foram coletados e seus pesos absolutos aferidos. O peso relativo desses órgãos foi obtido utilizando a fórmula: massa do órgão/massa ponderal x 100. Em seguida, esses mesmos órgãos foram fixados em formalina 10% por 24h para posterior análise histológica. O protocolo experimental foi repetido para se obter um número final de 6 animais por grupo.

4.4 TOXICIDADE SUBAGUDA

Foi utilizada a metodologia recomendada pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2008). Camundongos albinos swiss (*Mus musculus*, 60 dias) foram divididos cinco em grupos com cinco animais por gaiola e por sexo. Os animais foram tratados durante 28 dias consecutivos por via oral com EAFCi nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg (grupo tratado) ou água potável (grupo controle), o grupo satélite recebeu a dose de 400 mg/kg e em seguida ficou 14 dias sem tratamento, para verificar se há reversão dos sinais de toxicidade (quando houver). A massa corporal, ingestão de alimentos e água dos animais foram registrados semanalmente durante todo tratamento. Sinais de toxicidade, como piloereção, diarreia e alterações na atividade locomotora e mortalidade foram observados durante o período experimental. No final do vigésimo oitavo dia, os animais foram anestesiados com ketamina (0,35 mL/kg) e xilazina (0,10 mL/kg), por via intraperitoneal, o sangue foi coletado por punção cardíaca para a realização dos exames hematológicos e bioquímico; e os órgãos (fígado, rime baço) foram removidos, pesados e suas massas expressas em termos absolutos (g) e relativo (g/100g de massa do animal). Posteriormente foi realizada a análise histológica.

4.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para análise bioquímica, o sangue total foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos para coleta do soro e, em seguida, foram determinados os seguintes parâmetros: glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e proteínas totais. Os ensaios foram realizados usando kits comerciais de diagnóstico padronizados da LABTEST®, em aparelho automatizado (LABMAX).

4.6. ANÁLISE HEMATOLÓGICA

As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos com EDTA. Em seguida foi feita a contagem de hemácias, a determinação de eritrócito, leucócitos, hematócrito, hemoglobina, o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração da hemoglobina

corpúscular média (CHCM). As determinações foram realizadas em analisador hematológico celular automático (Horiba diagnostic ABX®)

4.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Análise histológica: Após laparotomia, os órgãos (fígado, rins e baço) foram removidos e fixados em formalina (formol a 10%) por 24h. Após fixação, as amostras foram lavadas em água corrente e imersas em álcool 70% até a realização da análise histológica. Os órgãos foram impregnados e incluídos em parafina, posteriormente, foram obtidos fragmentos tissulares seccionados em espessura de 5,0 µm e corados com hematoxilina-eosina. A análise histológica dos órgãos foi realizada por análise microscópica.

Análise Morfométrica: O estudo morfométrico foi realizado segundo a metodologia descrita por Engelman et al. (2001). Foi determinada por métodos estereológicos, a proporção entre o parênquima não lobular (espaço porta, veias centro-lobulares e ramos da veia hepática) e lobular (hepatócitos, sinusóides, espaço de Disse e ductos biliares) do fígado dos animais dos grupos experimentais, utilizando uma quadrícula com 100 pontos-teste, colocada sobre os cortes das preparações histológicas coradas pela hematoxilina-eosina. A contagem foi feita em três preparações histológicas, de maneira que, foram contados 10 campos utilizando-se a objetiva de 40X, perfazendo um total de 5.000 pontos por grupo.

Para a análise morfométrica dos rins, foram utilizadas três preparações histológicas de cada grupo e analisados dez glomérulos em cada lâmina. As medidas foram restritas aos glomérulos que demonstraram os polos vascular e urinário. Essa disposição indica a secção coincidente com a região equatorial do glomérulo. Para as mensurações foram utilizados os glomérulos selecionados ao acaso. A captura da imagem foi efetuada através de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50. A morfometria foi realizada através de aplicativo Morfometria de Linhas, calibrado em micrômetros, associado ao programa Optimas® 6.2 para Windows. Para a obtenção da área glomerular posicionou-se o cursor na área central do glomérulo, estabelecendo-se, a partir daí, uma linha circular externa, coincidente com os limites do tufo glomerular. Para mensuração da cápsula de

Bowman foi adotado a mesma metodologia (Akaoka et al., 1994). O volume glomerular e da cápsula de Bowman, foi calculado de acordo com os critérios preconizados por Pagtalunan et al. (2000). Para essa estimativa, utilizou-se a equação $4/3\pi r^3$, destinada ao cálculo do volume da esfera, na qual “r” representa o raio.

Para análise morfométrica, foram utilizadas duas lâminas de cada grupo e as regiões do disco placentário foram analisadas. As medidas foram restringidas das regiões do labirinto, trofospongio e células trofoblásticas gigantes. A captura da imagem foi efetuada por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50. A morfometria foi realizada através de aplicativo Morfometria de Linhas, calibrado em micrômetros, associado ao do programa Optimas® 6.2 para Windows. A morfometria de linhas foi utilizada para a medição da área total do disco placentário e de suas camadas. Para a quantificação dos elementos constituintes das camadas do disco placentário, utilizou-se uma grátula de 110 pontos, para identificação das estruturas e células, as quais foram classificadas em: (1) Vascularização materna; (2) Células trofoblásticas pequenas - indiferenciadas (em contato com vasos fetal); (3) Células intermediárias (em contato com vasos maternos); (4) Células trofoblásticas gigantes (binucleadas); (5) Células sinciciais (próximas a região do trofoblasto) e (6) Mesênquima, na região do trofospongio, e na região do labirinto em: (1) Trofoblasto sincicial; (2) Parede de vasos fetais; (3) Lúmen de vasos fetais e (4) Leito vascular labiríntico (vaso materno), sendo analisados na objetiva de 40X, escolhidos aleatoriamente 10 campos, por lâmina, com três repetições, perfazendo um total de 1.100 pontos (Lemos et al., 2014; Silva et al., 2015).

4.8 TOXICIDADE REPRODUTIVA

Dois protocolos experimentais foram utilizados para avaliar os riscos toxicológicos do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* baseados nas recomendações da OECD, 421 para testes com ratas Wistar. Os protocolos realizados abrangeram diferentes períodos de exposição.

- ✓ Período de acasalamento

As fêmeas nulíparas foram colocadas em contato com o macho adulto na proporção 2:1. No dia seguinte, foi realizado o lavado vaginal com NaCl 0,9%. A confirmação do acasalamento foi feita baseada na presença de espermatozóide no lavado coletado associado ao diagnóstico da fase estro do ciclo estral. Assim, a presença do espermatozóide determinou o dia 0 de prenhez. Os acasalamentos foram mantidos até a obtenção do número suficiente de ratas prenhes (n= 40). Após a confirmação do acasalamento, as ratas foram aleatoriamente divididas em dois protocolos experimentais: período de embriogênese e período de organogênese

✓ Período da embriogênese

No primeiro protocolo, as ratas fêmeas foram tratadas diariamente durante o período de pré-implantação (1º ao 6º dia de prenhes) e divididas em grupo controle (que recebeu água potável, n=10) e grupos tratados por via oral com EAF*Ci* nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg (n= 10 por grupo).

As ratas foram observadas quanto à sobrevivência, mudanças na alimentação e ingestão de água e alteração nos sinais clínicos de toxicidade, tais como, piloereção, diarreia, mudança de atividade locomotora e sangramento vaginal. O ganho de massa materno foi determinado diariamente durante o período.

No sétimo dia da prenhez, as ratas foram anestesiadas com ketamina (60 mg/kg e xilazina (6 mg/kg, i.p.). Foi realizada a laparotomia e seus cornos uterinos removidos para a quantificação do número de implantações (Figura 3). Os ovários foram coletados, pesados e seus corpos lúteos contados (Figura 4).

Figura 3: Útero gravídico de rata controle com 7 dias de prenhez. As setas indicam pontos de implantação uterina

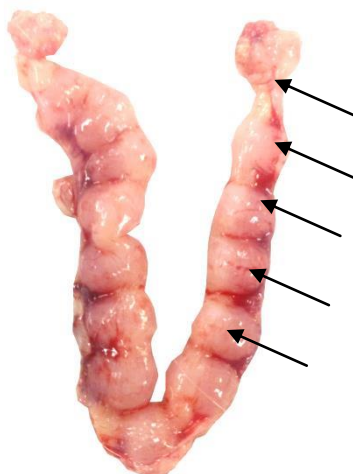
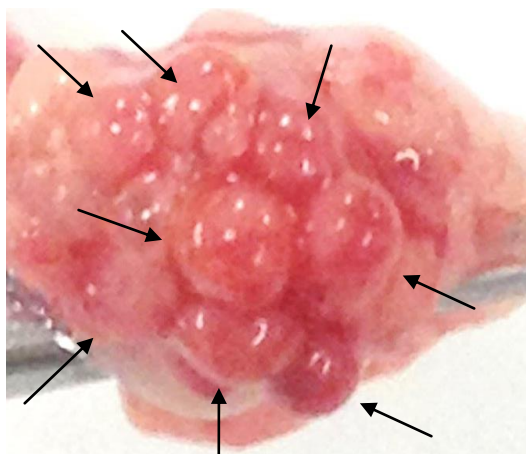


Figura 4: Ovário de rata controle com sete dias de prenhez. As setas indicam os corpos lúteos.



Fonte: a autora, 2016.

A taxa de perda de pré-implantação foi determinada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Perdas pré-implante: } \frac{\text{Número de corpos lúteos} - \text{número de implantações}}{\text{Número de corpos lúteos}} \times 100$$

Os órgãos maternos (fígado, pulmão, coração, adrenais, rins e baço) foram coletados e pesados e avaliados quanto à presença de alterações macroscópicas.

✓ Período da Organogênese

No segundo protocolo experimental, as ratas prenhes foram tratadas diariamente do 6º dia ao 15º dia de gestação (período da organogênese) com água potável (grupo controle, n=10) ou com o EAF*Cl* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg por via oral (n=10, por grupo). Os sinais clínicos de toxicidade como: diarreia, piloereção, estresse, atividade motora e sangramento foram avaliados diariamente, assim como o consumo de ração e água e o ganho de peso das progenitoras. No 21º dia, os animais foram eutanasiados e os seguintes parâmetros foram avaliados:

✓ Perdas pós-implantes

$$(\text{Nº de Implantações} - \text{Nº de Fetos Vivos} / \text{Nº de Implantações}) \times 100$$

✓ Índice placentário

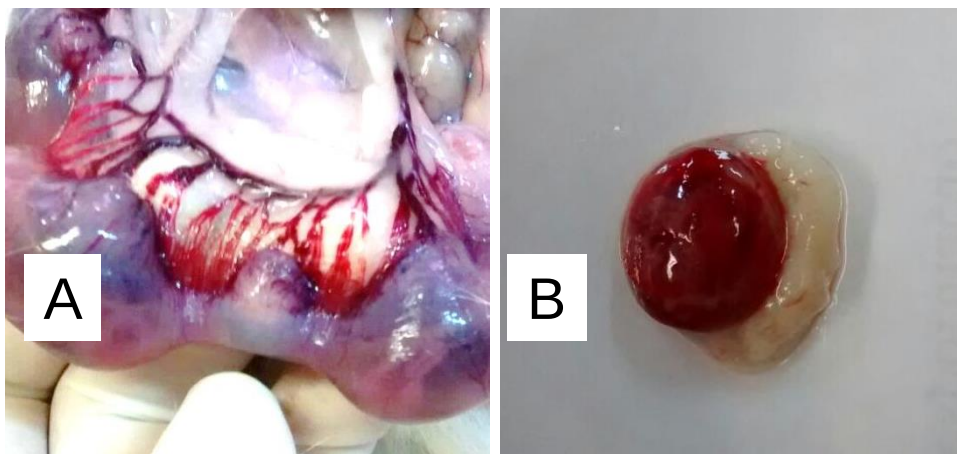
Os fetos e suas respectivas placentas foram retirados e pesados para calcular o índice placentário

$$\text{Massa das placentas} / \text{Massa dos fetos}$$

✓ Índice de reabsorções prévias e tardia

Foi considerada uma reabsorção prévia, quando observado um sítio de implantação na ausência de placenta (Figura 5A). A reabsorção tardia foi caracterizada pela presença de placenta e ausência de feto ou feto morto com alterações degenerativas externas (5B).

Figura 5: Útero gravídico de rata com reabsorção prévia (A). Placenta de rata com reabsorção tardia (B)



Fonte: OLIVEIRA, 2015.

✓ Massa relativa e absoluta dos órgãos maternos

Os órgãos maternos (fígado, pulmão, coração, adrenais, rins e baço) foram coletados, pesados e analisados macroscopicamente quanto à textura e cor.

✓ Razão Sexual

A determinação da razão sexual dos fetos foi determinada pela relação entre número de machos e fêmeas. A forma de sexar faz-se observando a distância ano-genital: o macho é maior em aproximadamente 2 vezes em relação à fêmea.

✓ Teste para confirmação de sítio de implantação e reabsorções

Em caso de ausência de desenvolvimento fetal e sítios de absorções visíveis, o útero foi emerso em uma solução de NaOH 0,2%, para revelação dos possíveis pontos de implantação (Figura 6) (LIMA, 2011).

Figura 6: Útero hysterectomizado com as implantações reveladas por NaOH 0,2 %.



Fonte: OLIVEIRA, 2015.

✓ **Análise das anomalias e/ou malformações externas**

Foi realizada uma análise minuciosa da boca, conformação craniana, membros anteriores e posteriores, perfuração anal e cauda, de acordo com os critérios estabelecidos por Wilson (1965) (Figura 7).

Figura 7 - Análise das anomalias e/ou malformações externas dos fetos de rata Wistar (grupo controle).

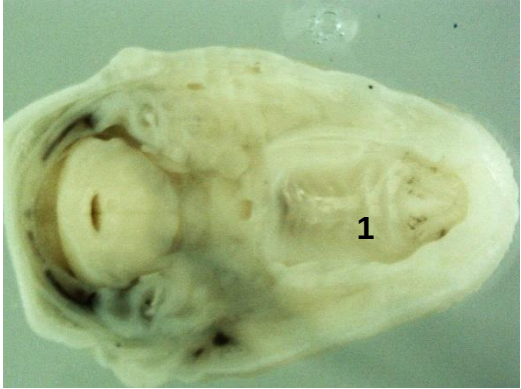
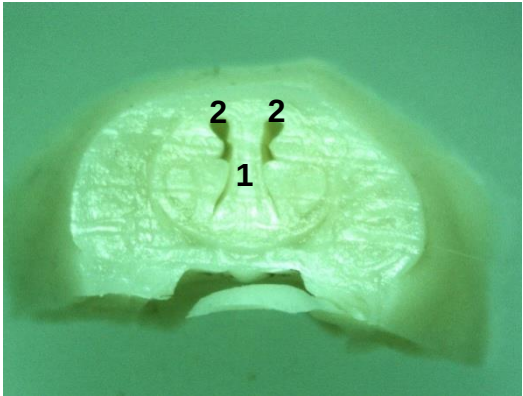
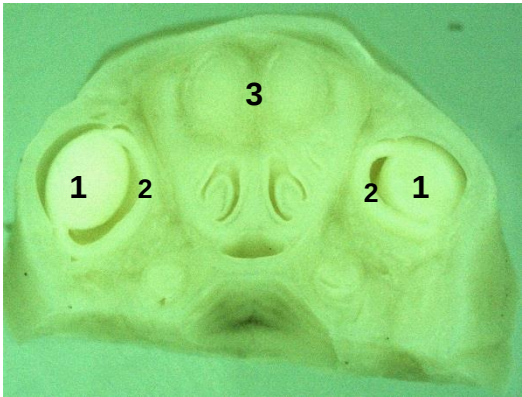


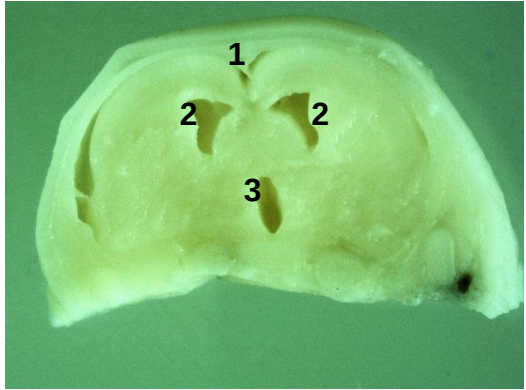
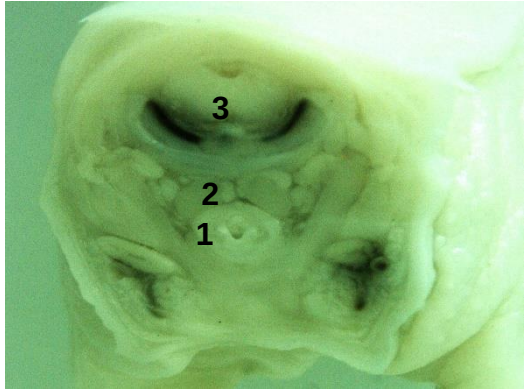
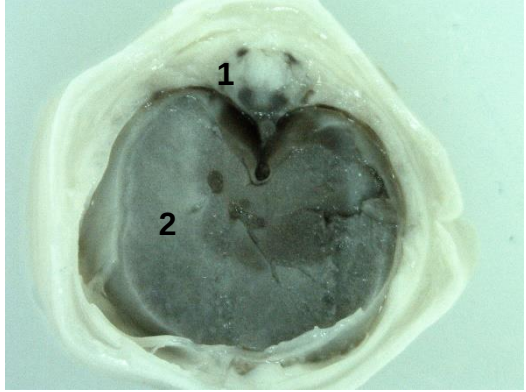
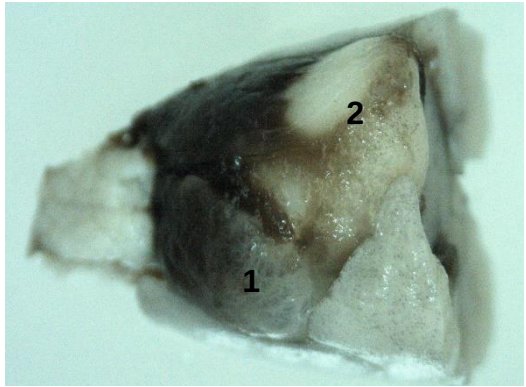
Fonte: a autora, 2016

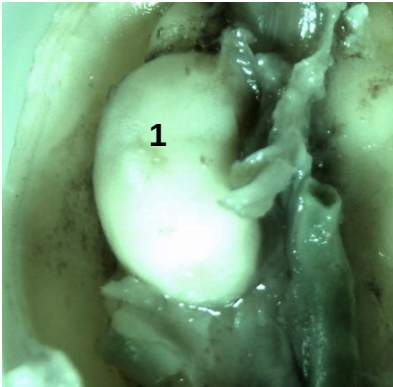
✓ Análise das anomalias e/ou malformações viscerais

Metade de cada ninhada foi fixada em uma solução de Bouin para subsequente exame visceral pelo método de secção seriada de Wilson (1965). Foi realizada uma análise detalhada das secções da cabeça, tórax e pelve (Tabela 2).

Tabela 2: Secções seriadas de Wilson de fetos de ratas Wistar

Estruturas Observadas	
Secção da cabeça. 1- Palato	
Secção da cabeça 1- Septo Nasal 2- Coana	
Secção da cabeça 1- Cristalino 2- Retina 3- Bulbo Olfatório	

Secção da cabeça 1- Seio venoso 2- Ventrículos laterais 3- Terceiro ventrículo	
Secção do pescoço 1- Traqueia 2- Esôfago 3- Medula espinhal	
Secção do tórax 1- Medula espinhal 2- Pulmão 3-	
Secção do tórax 1- Pulmão 2- Coração	

Secção do tórax 1- Pulmão 2- Coração	
Secção do tórax (região lombar) 1- Rim	
Secção da pelve 1- Testículos 2- Bexiga	
Secção da pelve 1- Ovários 2- Útero 3- Bexiga	

Fonte: a autora, 2016

✓ Análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas

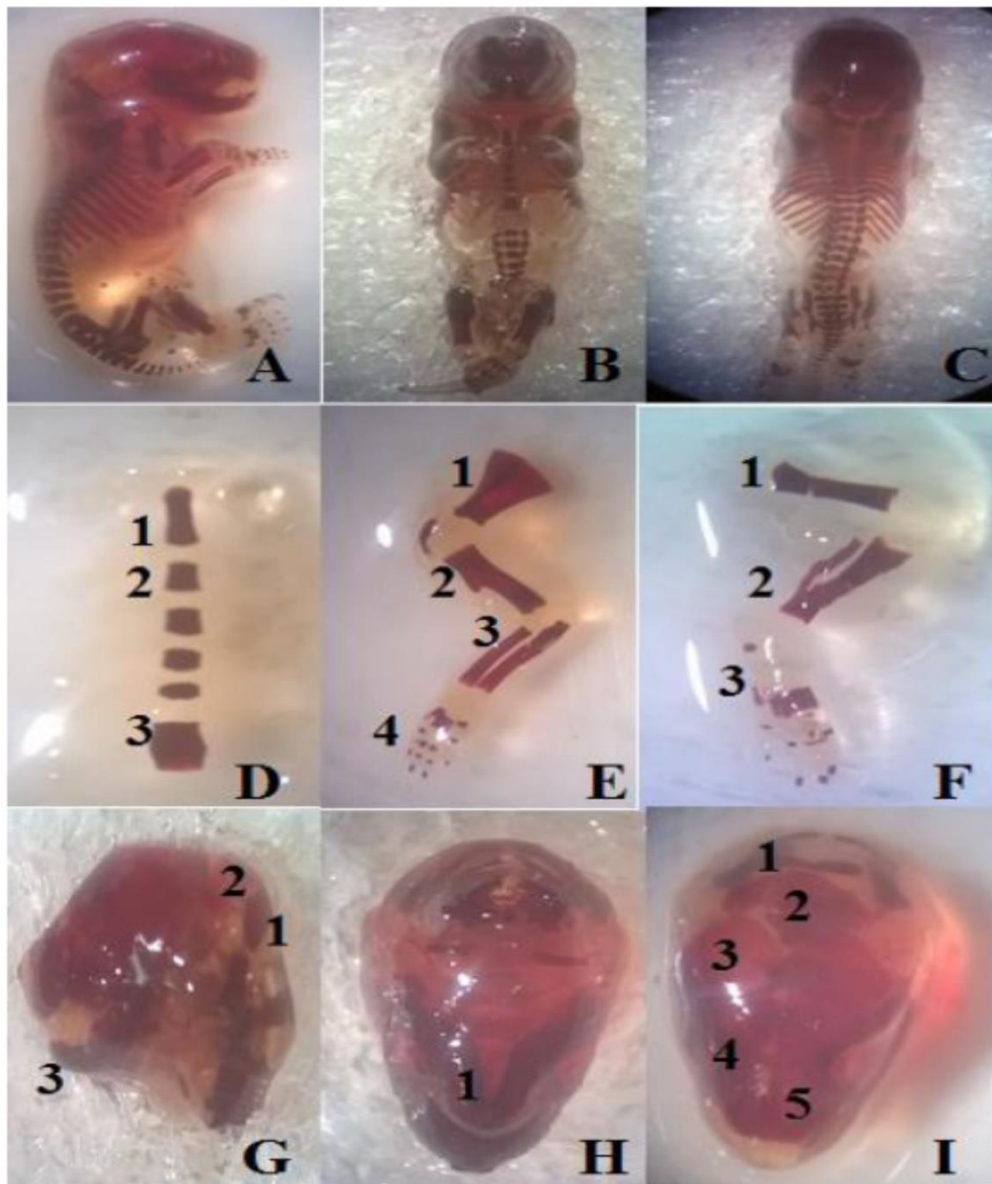
Após a análise externa dos fetos, metade de cada ninhada foi colocada em álcool 70% por 24h e posteriormente em acetona por 24 h, depois foram eviscerados e corados com vermelho de alizarina para investigação das alterações esqueléticas pela técnica de Staples e Schenell (1964). Após a obtenção da coloração do esqueleto, os fetos foram conservados em glicerina 100%. (Figura 8 e 9).

Figura 8: Análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas dos fetos de rata Wistar (grupo controle).



Fonte: a autora, 2016

Figura 9: Pontos de ossificação normal de fetos controles. a) Vista lateral; b) Vista ventral; c) Vista dorsal; d) Esterno: 1- Manúbrio, 2- Centros esternais (Esternébras), 3- Processo xifoide; e) Membro anterior: 1- Escápula, 2- Úmero, 3- Rádio e ulna, 4- Carpos, metacarpos e falanges; f) 1- Fêmur, 2- Tíbia e fíbula, 3- Tarsos, metatarsos e falanges; g) Vista lateral crânio: 1- Supraoccipital, 2- Interparietal, 3- mandíbula; h) Vista ventral crânio: 1-



Fonte: Moura, 2016

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos de toxicidade aguda e subaguda foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. O número de implantações e reabsorções, as taxas de implantação e de perdas pré-implantação e pós-implantação, bem como os dados de teratogênese foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados morfométricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. A análise estatística foi realizada no Graph Pad Prism 5.0 Software e o nível de significância foi fixado em $p < 0.05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A partir da análise por cromatografia em camada delgada, foi possível identificar a presença de taninos e flavonoides (Tabela 3) no EAFCi. Esses achados corroboram com o estudo realizado por White et. al., (2010), onde foi encontrada a presença de taninos e flavonas no extrato aquoso das folhas de *C. icaco*.

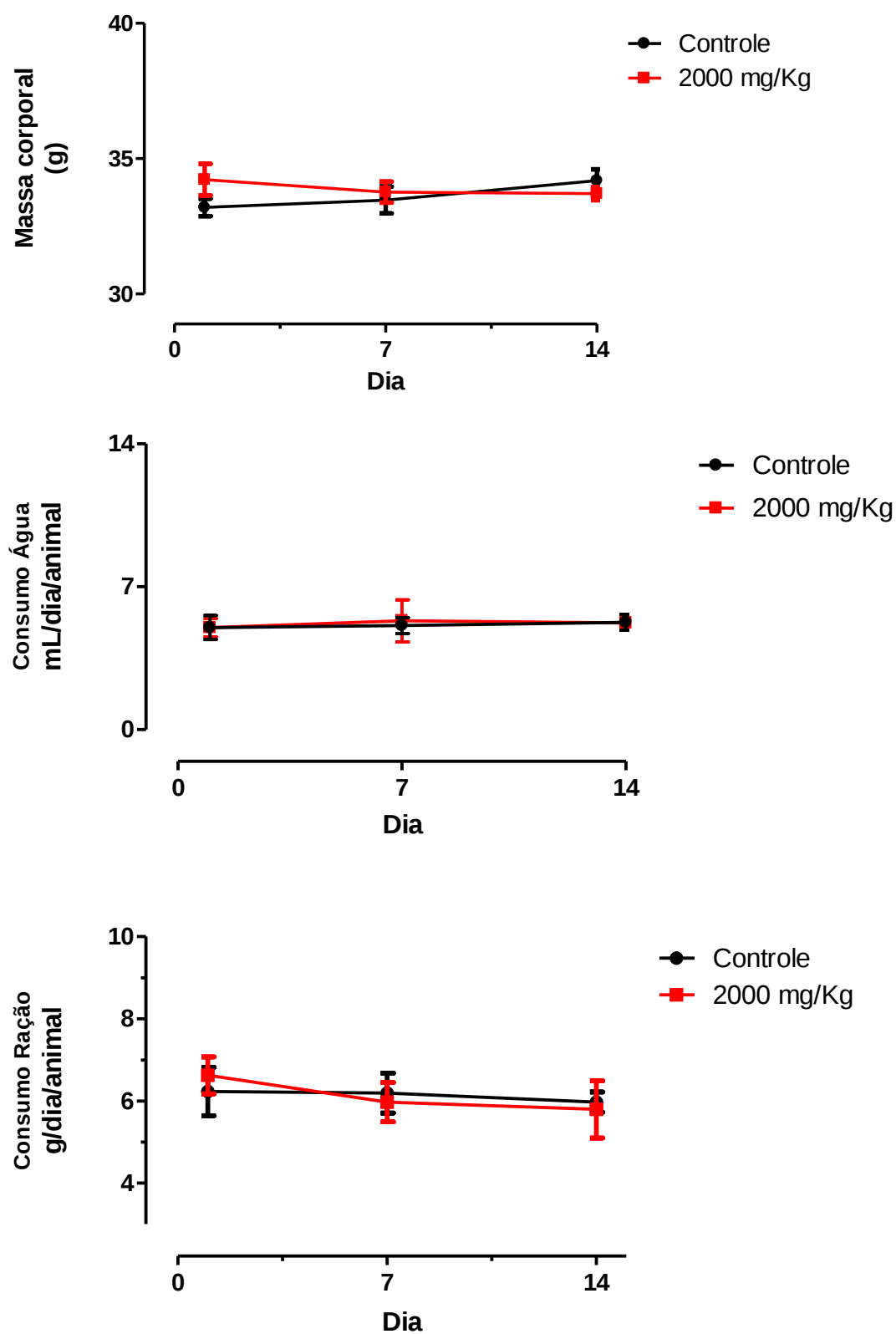
Tabela 3. Prospeção fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco*.

Classe química	Procedimentos de extração	Extrato
Taninos	Cloreto Férrico	+
Alcaloides	Dragendorff	-
Flavonoides	Cloreto de Alumínio/Sulfato cérico	+
Terpenóides	Lieberman/Anisaldeído/sulfato cérico	-
Antraquinona cumarina (-) Não detectável; (+) Presente	Hidróxido de Potássio	-

6.2 TOXICIDADE AGUDA

O extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* na dose de 2.000 mg/kg administrado por via oral em camundongos fêmeas, não produziu morte e não causou alteração comportamental no período de 14 dias de observação. A massa corpórea (Figura 10A), o consumo de ração (Figura 10B) e o consumo de água (Figura 10C) não foram diferentes do grupo controle.

Figura 10: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 2000mg/kg), por via oral sobre a massa corpórea de camundongos *Mus musculus* fêmeas (A); consumo de ração (B) e consumo de água (C).



Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. ($n = 6/\text{grupo}$). ($p < 0,05$) (teste t).

Nenhuma diferença clínica significativa foi registrada no perfil hematológico dos animais do grupo tratado quando comparado ao controle (Tabela4)

Tabela 4: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFci 2000 mg/kg), por via oral sobre os parâmetros hematológicos de camundongos *Mus musculus* fêmeas.

Parâmetros	Controle	EAFci(2000mg/kg)
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$8,2 \pm 1,8$	$7,9 \pm 3,1$
Hemácias ($\text{k}/\mu\text{L}$)	$7,9 \pm 0,6$	$7,9 \pm 1,4$
Hemoglobina (g/dL)	$13,3 \pm 0,9$	$13,1 \pm 1,2$
Hematócrito (%)	$41,1 \pm 3,3$	$41,4 \pm 8,2$
Plaqueta ($10^3/\mu\text{L}$)	$526 \pm 88,3$	$477 \pm 27,4$
VCM (fL)	$51,8 \pm 1,1$	$52,1 \pm 2,4$
HCM (pg)	$16,9 \pm 0,7$	$16,8 \pm 1,9$
CHCM (g/dL)	$32,5 \pm 1,3$	$32,4 \pm 4,8$
RDW (%)	$13,4 \pm 1,6$	$13,4 \pm 2,5$
VPM (fL)	$7,1 \pm 0,9$	$7,5 \pm 1,3$
LINFÓCITO (%)	$79,1 \pm 2,7$	$80,0 \pm 7,5$
MONÓCITO (%)	$10,5 \pm 2,5$	$8,1 \pm 2,3$
GRANULÓCITOS (%)	$10,8 \pm 3,5$	$12,8 \pm 8,4$

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão da média ($n = 6/\text{grupo}$). VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias e VPM: Volume Plaquetário Médio. ($p < 0,05$) (teste t)

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de glicose, triglicerídeos, fosfatase alcalina, proteínas totais, AST, ALT, ureia e creatinina (Tabela 5)

Tabela 5: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 2000 mg/kg), por via oral sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos *Mus musculus*

Parâmetros	Controle	EAF <i>ci</i> (2000mg/kg)
Glicose (mg/dL)	130,10 ± 6,39	136,85 ± 10,26
Ureia (mL/dL)	45,66 ± 6,65	47,33 ± 6,26
Creatinina (mg/dL)	0,20 ± 0,08	0,20 ± 0,05
Triglicerídeos (mg/dL)	93,20 ± 13,91	88,5 ± 6,26
AST (U/L)	133,75 ± 2,50	138,46 ± 9,71
ALT (U/L)	51,40 ± 8,56	50,30 ± 3,74
Fosfatase Alcalina (U/L)	226,60 ± 3,51	235,00 ± 4,10
Proteínas Totais	5,60 ± 0,59	5,50 ± 0,70

Valores representam a média ± desvio padrão da média (n = 6/grupo).

AST:aspartatoaminotransferase, ALT:alanina-aminotransferase.(p<0,05)

(teste t)

O peso absoluto e relativo do fígado, rins e baço não foram afetados com a administração aguda do EAF*ci* (Tabela 6). Também não foram encontradas alterações morfológicas externas na textura ou cor desses órgãos quando comparados ao grupo controle.

Tabela 6: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 2000 mg/kg), por via oral sobre o peso absoluto e relativo de camundongos *Mus musculus* fêmeas.

Órgãos	Controle	2000 mg/Kg
Fígado (g)	2,53 ± 0,33	2,33 ± 0,26
Fígado (%)	7,36 ± 0,70	6,69 ± 0,36
Rim (g)	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,03
Rim (%)	0,55 ± 0,09	0,52 ± 0,07
Baço (g)	0,30 ± 0,06	0,30 ± 0,07
Baço (%)	0,92 ± 0,15	0,84 ± 0,20

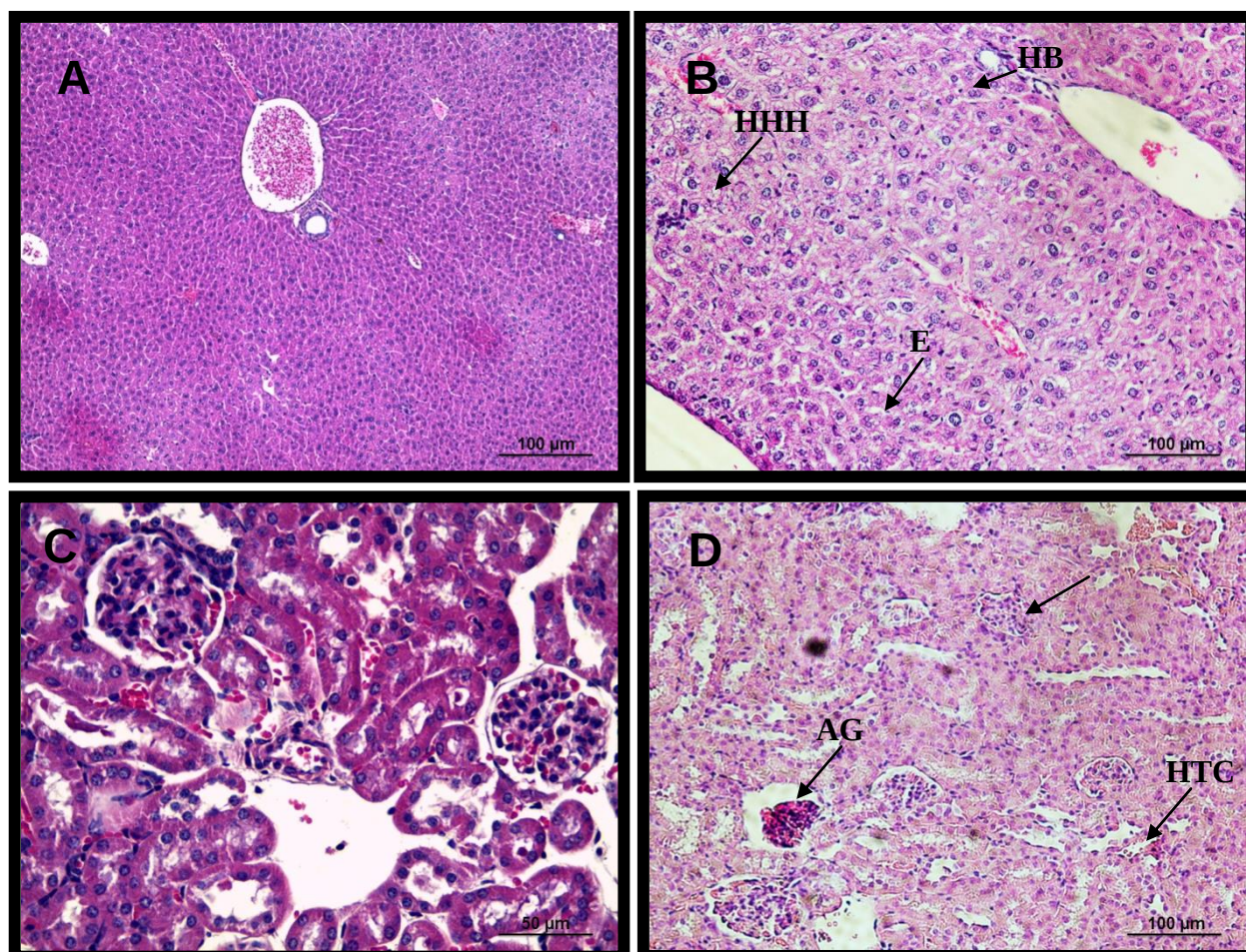
Valores representam a média ± d.p.m. (n = 6/grupo). (p<0,05) (teste t)

A análise microscópica mostrou que o EAF*ci* produziu uma pequena lesão hepática, sendo observada congestão de veias centrolobulares, hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos e estes superativados com mais de cinco nucléolos, microesteatose pericentrolobular discreta, multifocal e difusa. Os achados descritos são sugestivos de desafio tóxico, no entanto o órgão não apresentou processos degenerativos que indicassem efeitos deletérios da dose de 2.000 mg/kg de EAF*ci* com avaliação após 14 dias (Figura 11A e B).

Na região do córtex renal foi observada atrofia glomerular discreta, glomerulo nefrite proliferativa, degeneração hidrópica e início de nefrose nos túbulos contorcidos. O EAF*ci* provocou ligeira toxicidade em grau discreto quando administrado em dose única de 2.000mg/kg em camundongos (Figura 11 B e D).

Não foram observadas alterações histológicas no baço dos animais submetidos ao EAF*ci*.

Figura 11– Fotomicrografia hepáticas (A e B) e renais (C e D) de camundongos fêmeas tratados com o extrato aquoso das folhas de *C. icaco*. HE. (A e C) Controle e (B e D) EAF*ci* 2000 mg/kg



HHH: Hipertrofia e Hiperplasia de hepatócitos; **E:** esteatose; **HB:** Hepatócitos binucleados; **AG:** Atrofia glomerular; **HCT:** Hidropisia de túbulo contorcido; **GN:** Glomerulonefrite.

Os testes toxicológicos realizados em animais experimentais visam fornecer informações seguras sobre os efeitos tóxicos produzidos por um agente químico, a natureza desses efeitos e as doses seguras de exposição (PIRES, et. al., 2012).

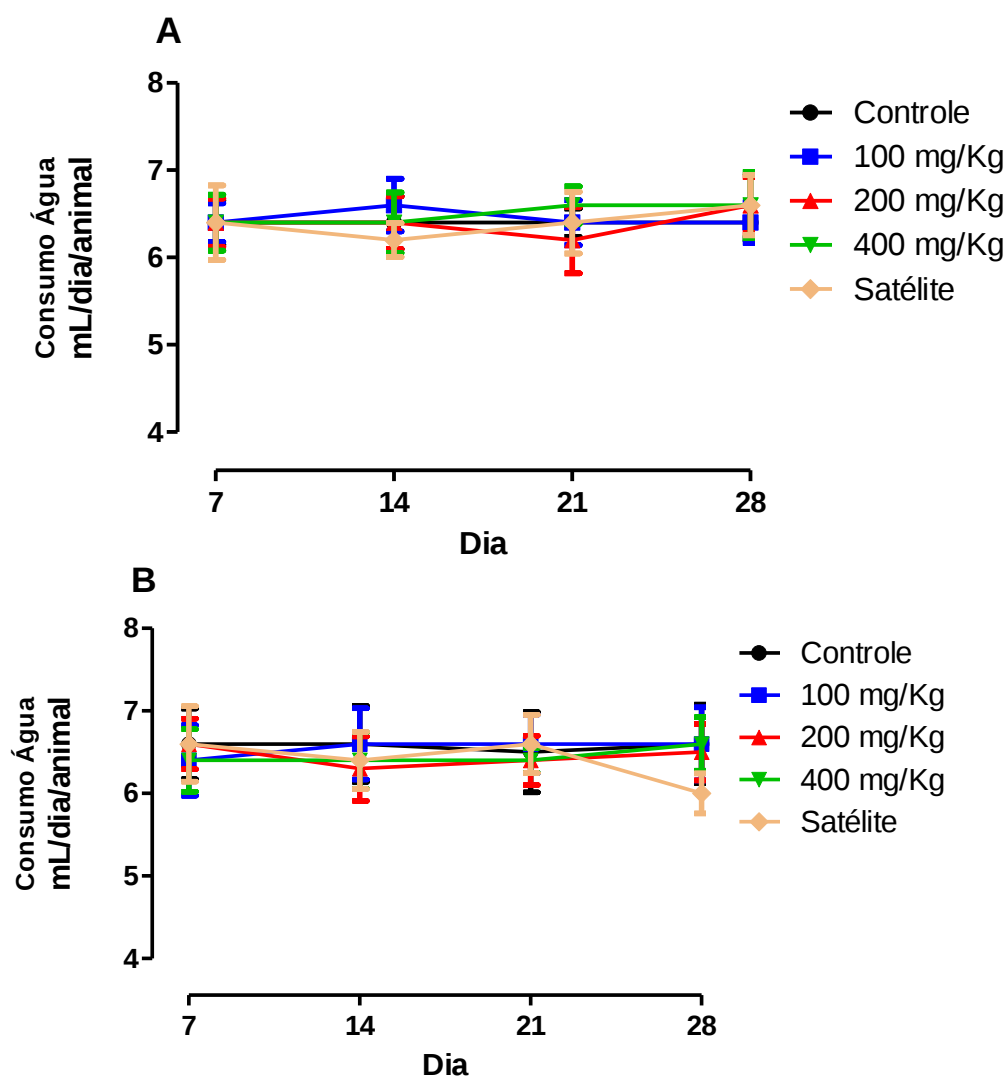
O extrato aquoso de *Chrysobalanus icaco* pode ser considerado de baixa toxicidade aguda de acordo com o método de classes recomendado pela OECD 423 (OECD, 2001) e enquadra-se na classe 5 (DL_{50} superior a 2.000 mg/kg), pois não foram registrados sinais de toxicidade geral como alterações no consumo de água e ração, no peso corpóreo e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, também não foram observados óbitos durante todo período experimental.

Ainda de acordo com a OECD, a próxima dose a ser testada seria a de 5.000 mg/Kg; entretanto, só é recomendado o estudo com essa dose em casos que justifiquem a sua necessidade. Esses achados corroboram com o estudo realizado por Oliveira et. al., (2014), onde foi observado que o extrato aquoso da entre casca de *C. icaco* não induziu sinais de toxicidade na dose de 2.000 mg/kg.

6.3 TOXICIDADE SUBAGUDA

A toxicidade sistêmica pode ser manifestada por alterações no consumo de água, ração e redução na massa corporal dos animais experimentais. Estes são parâmetros simples e extremamente sensíveis quando ocorre exposição a um agente tóxico, e podem ser utilizados como indicadores confiáveis do estado de saúde do animal (VOLPATO et al, 2015). Os animais tratados com o EAFCi nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg e o grupo satélite, durante 28 dias consecutivos, não apresentaram sinais de toxicidade (piloereção, diarreia e alteração na atividade locomotora) ou morte. O tratamento dos machos e das fêmeas com o EAFCi não comprometeu o consumo de água durante todo o período quando comparado ao grupo controle (Figura 12A e B).

Figura 12: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFCi) no consumo de água de camundongos machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28 dias consecutivos.



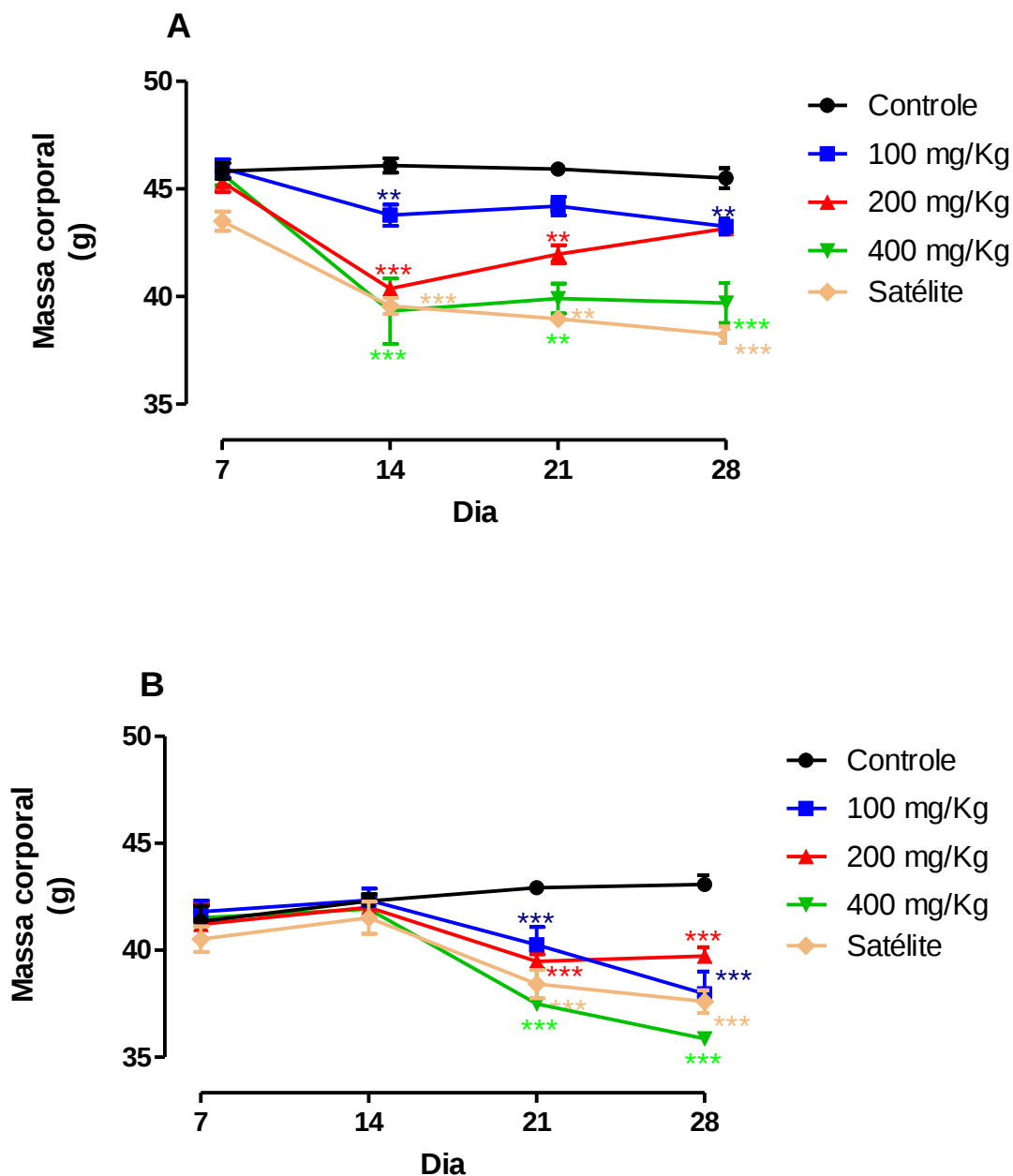
Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. ($n = 5/\text{grupo}$). Não significativo vs grupo controle, ANOVA, teste de Tukey.

Houve uma diminuição na massa corpórea dos camundongos machos e fêmeas, em todas as doses testadas, quando comparados aos seus respectivos grupo controle. Nos machos essa diminuição aconteceu a partir da segunda semana de tratamento e se estendeu até o final do experimento (Figura 13A). Nas fêmeas essa redução foi registrada na terceira e quarta semana de tratamento (Figura 13B). Adicionalmente, foi observada uma diminuição significativa no consumo de ração dos machos entre o 14º e 28º dia de tratamento (Figura 14A) e nas fêmeas a partir do 21º dia (Figura 14B) em todas as doses testadas. Os animais do grupo satélites (machos e fêmeas) também apresentaram uma redução na massa corpórea e no consumo de ração a partir da segunda semana de tratamento, ao final do período de observação desses animais (14º após o final da administração do EAF*Cl*), a massa corpórea e o consumo de ração desses animais não diferiram dos animais do grupo controle (dados não mostrados).

Substâncias ativas presentes no EAF*Cl* podem ter ocasionado inibição do apetite dos animais e como consequência, redução da massa corpórea, uma vez que os animais que ficaram em observação após o tratamento conseguiram reestabelecer o peso corporal.

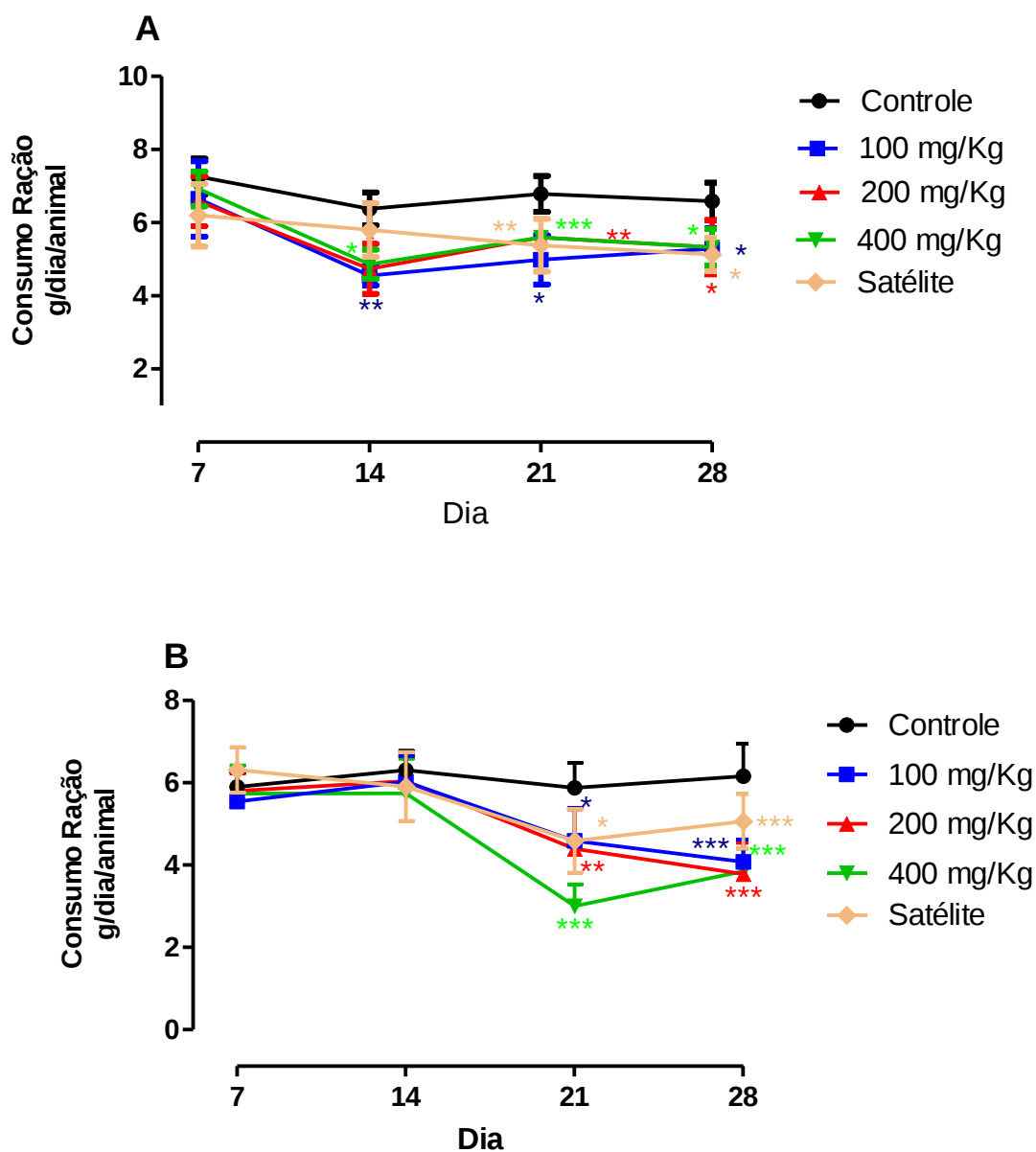
No estudo de toxicidade aguda, não foi observado alterações na massa corpórea em camundongos fêmeas tratados com 2.000 mg/Kg, em dose única. Pelo visto, a duração de tratamento foi responsável pela redução no consumo de ração. Entretanto, outras pesquisas são necessárias para identificar qual/quais os fatores que estariam possivelmente envolvidos na redução do apetite.

Figura 13: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci*) sobre a massa corpórea de camundongos machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28 dias consecutivos.



Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. (n= 5/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Tukey, *p <0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Figura 14: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci*) no consumo de ração camundongos machos (A) e fêmeas (B) tratados por via oral durante 28 dias consecutivos.)



Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. (n= 5/grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Tukey, *p <0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Alterações hematológicas e bioquímicas também podem expressar a toxicidade sistêmica de uma substância. Os parâmetros hematológicos são importantes devido à alta sensibilidade do sistema hematopoiético a agentes tóxicos, que podem resultar em alterações transitórias ou permanentes (Silva et al, 2016)

As Tabelas 7 e 8 mostram o perfil hematológico dos animais controles e dos animais tratados com o EAFCi. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa nos parâmetros analisados no grupo dos machos (Tabela 7) e das fêmeas (Tabela 8) tratadas em relação aos animais do grupo controle. Este resultado sugere que o EAFCi não desencadeou nenhuma resposta inflamatória imunossupressora na análise destes parâmetros hematológicos.

Tabela 7: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos camundongos *Mus musculus* machos tratados por 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	100mg/Kg	200mg/Kg	400mg/Kg	Satélite
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,85 $\pm$ 1,68	8,60 $\pm$ 0,76	6,90 $\pm$ 1,04	6,50 $\pm$ 0,29	6,48 $\pm$ 1,70
Hemácias (k/ μL)	8,22 $\pm$ 0,86	8,37 $\pm$ 0,45	7,73 $\pm$ 0,61	7,33 $\pm$ 0,86	8,67 $\pm$ 0,70
Hemoglobina (g/dL)	13,9 $\pm$ 0,36	13,5 $\pm$ 0,24	13,7 $\pm$ 0,33	13,7 $\pm$ 0,87	12,6 $\pm$ 0,57
Hematócrito (%)	42,6 $\pm$ 1,75	40,1 $\pm$ 1,43	38,6 $\pm$ 2,62	39,8 $\pm$ 3,19	43,4 $\pm$ 2,93
Plaqueta ($10^3/\mu\text{L}$)	727 $\pm$ 37,8	747 $\pm$ 87,7	666 $\pm$ 54,2	665 $\pm$ 66,4	626 $\pm$ 102,71
VMC (fL)	50,4 $\pm$ 0,54	48,6 $\pm$ 0,89	49,6 $\pm$ 0,83	51,6 $\pm$ 2,96	50,2 $\pm$ 0,83
HCM (pg)	16,6 $\pm$ 0,96	16,2 $\pm$ 0,72	17,8 $\pm$ 1,12	18,1 $\pm$ 0,97	15,5 $\pm$ 1,32
CHCM (g/dL)	33,1 $\pm$ 1,62	33,7 $\pm$ 0,81	35,6 $\pm$ 1,87	35,0 $\pm$ 1,10	32,1 $\pm$ 4,08
RDW (%)	12,8 $\pm$ 0,71	13,4 $\pm$ 0,51	13,9 $\pm$ 0,96	13,6 $\pm$ 0,38	12,4 $\pm$ 0,32
VPM (fL)	6,78 $\pm$ 1,78	6,88 $\pm$ 1,23	7,18 $\pm$ 0,51	7,64 $\pm$ 1,41	7,1 $\pm$ 1,79
LINFÓCITO (%)	73,5 $\pm$ 6,53	71,2 $\pm$ 2,24	71,6 $\pm$ 6,87	66,9 $\pm$ 5,56	74,9 $\pm$ 5,0
MONÓCITO (%)	8,05 $\pm$ 1,17	6,87 $\pm$ 0,25	6,62 $\pm$ 1,4	8,8 $\pm$ 1,77	7,52 $\pm$ 0,92
GRANULÓCITOS (%)	23,2 $\pm$ 1,4	23,05 $\pm$ 1,0	23,20 $\pm$ 2,7	19,15 $\pm$ 4,5	19,54 $\pm$ 3,3

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão da média (n = 5/grupo). Não significativo vsgrupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias e VPM: Volume Plaquetário Médio.

Tabela 8: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos camundongos *Mus musculus* fêmeas tratadas por 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	100mg/Kg	200mg/Kg	400mg/Kg	Satélite
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	5,98 $\pm$ 0,61	5,75 $\pm$ 0,68	5,02 $\pm$ 0,63	6,07 $\pm$ 0,49	6,56 $\pm$ 0,53
Hemácias (k/ μL)	5,70 $\pm$ 0,77	6,0 $\pm$ 1,77	6,68 $\pm$ 0,65	6,25 $\pm$ 0,45	6,91 $\pm$ 1,06
Hemoglobina (g/dL)	12,4 $\pm$ 1,30	12,0 $\pm$ 3,24	13,7 $\pm$ 1,30	13,0 $\pm$ 0,99	12,54 $\pm$ 1,11
Hematócrito (%)	27,4 $\pm$ 3,24	28,3 $\pm$ 3,24	31,6 $\pm$ 3,52	29,4 $\pm$ 3,12	25,0 $\pm$ 4,52
Plaqueta ($10^3/\mu\text{L}$)	420 $\pm$ 94,58	512 $\pm$ 48,1	490 $\pm$ 52,6	443 $\pm$ 78,6	445 $\pm$ 78,91
VMC (fL)	48,2 $\pm$ 2,16	47,2 $\pm$ 1,48	49,0 $\pm$ 2,34	47,2 $\pm$ 3,03	51,0 $\pm$ 0,81
HCM (pg)	21,8 $\pm$ 1,47	20,3 $\pm$ 0,96	20,9 $\pm$ 0,75	20,8 $\pm$ 1,29	22,08 $\pm$ 1,16
CHCM (g/dL)	45,3 $\pm$ 1,47	43,1 $\pm$ 2,03	42,8 $\pm$ 0,80	44,3 $\pm$ 2,13	44,38 $\pm$ 2,08
RDW (%)	12,7 $\pm$ 0,78	12,3 $\pm$ 1,19	12,4 $\pm$ 0,36	12,8 $\pm$ 0,95	12,58 $\pm$ 0,64
VPM (fL)	6,74 $\pm$ 0,90	7,16 $\pm$ 0,81	7,02 $\pm$ 0,97	6,96 $\pm$ 1,30	6,14 $\pm$ 1,09
LINFÓCITO (%)	79,7 $\pm$ 8,47	75,7 $\pm$ 8,19	74,1 $\pm$ 7,05	68,4 $\pm$ 6,37	77,28 $\pm$ 5,06
MONÓCITO (%)	8,24 $\pm$ 1,90	8,54 $\pm$ 1,24	8,84 $\pm$ 1,73	11,0 $\pm$ 1,85	8,58 $\pm$ 1,12
GRANULÓCITOS (%)	18,9 $\pm$ 0,92	21,9 $\pm$ 2,2	21,7 $\pm$ 2,1	22,9 $\pm$ 2,8	18,05 $\pm$ 2,00

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão da média (n = 5/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias e VPM: Volume Plaquetário Médio.

As Tabelas 9 e 10 mostram os parâmetros bioquímicos dos animais dos grupos controle e tratado. Não foram observadas diferenças nos níveis de creatinina, ureia, glicose e proteínas totais.

Porém, houve um aumento nos níveis de AST de 30,3% nos machos tratados com 100 mg/kg, 33,9% no grupo tratado com 200 mg/Kg e 34,59% nos machos tratados com 400 mg/kg. Esses animais também apresentaram elevação nos níveis de ALT sérico (59,2% no grupo tratado com 100 mg/kg; 46,3% nos animais tratados com EAF*Ci* na dose de 200 mg/kg e 55,68% nos machos que receberam 400 mg/kg do extrato) quando comparados ao controle. O grupo de machos que recebeu 400 mg/kg apresentou um elevado nível sérico de fostasase alcalina (24,8%).

Nas fêmeas, foi encontrado um aumento nos níveis de AST nas doses de 200 e 400 mg/kg (19,2% e 20,79% respectivamente) e de ALT nas doses de 100 mg/kg (26,7%); 200 mg/Kg (27,4%) e 400 mg/Kg (29,7%).

Os grupos satélites (machos e fêmeas) não apresentaram diferenças estatísticas nos níveis das enzimas hepáticas em relação ao grupo controle.

Tabela 9: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos camundongos *Mus musculus* machos tratadas por 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg	Satélite
Glicose (mg/dL)	146,5 ± 16,36	158,2± 15,66	137,5 ± 18,88	157,0± 18,92	139,8 ± 12,35
Ureia (mL/dL)	50,17 ± 3,18	53,50± 2,38	50,22 ± 2,82	48,72± 3,95	43,53 ± 1,87
Creatinina (mg/dL)	0,32± 0,02	0,32± 0,08	0,32± 0,04	0,34± 0,08	0,40 ± 0,14
Fosfatase Alcalina (U/L)	142,8± 15,29	161,6± 16,10	168,7± 22,13	177,2 ± 17,5*	150,4 ± 15,78
AST (U/L)	127,2± 4,29	165,4± 11,97***	169,3 ± 9,22***	171,2 ± 12,8***	119,1 ± 26,14
ALT (U/L)	42,83± 1,83	68,20± 9,88***	62,68± 6,53***	66,98± 3,90***	55 ± 12,24
Proteínas Totais	5,1 ± 0,38	4,87 ± 0,62	5,1 ± 0,40	4,92 ± 0,49	5,1 ± 0,23

Valores representam a média ± desvio padrão da média (n = 5/grupo). AST: aspartatoaminotransferase, ALT: alanina-aminotransferase. Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Tukey, *p <0,05)

Tabela 10: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos camundongos *Mus musculus* fêmeas tratadas por 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg	Satélite
Glicose (mg/dL)	133,6 ± 4,77	138,6 ± 11,72	140,6 ± 9,99	145,0 ± 7,98	135,25 ± 9,85
Ureia (mL/dL)	49,60 ± 2,608	48,75 ± 4,717	44,60 ± 3,209	47,20 ± 3,701	49,21 ± 2,16
Creatinina (mg/dL)	0,30 ± 0,07	0,32 ± 0,04	0,32 ± 0,15	0,32 ± 0,08	0,36 ± 0,05
Fosfatase Alcalina (U/L)	96,6 ± 5,81	102,8 ± 9,44	98 ± 6,87	96,2 ± 8,22	98,5 ± 7,50
AST (U/L)	126,5 ± 5,78	137,84 ± 3,34*	150,8 ± 8,87*	152,2 ± 7,36*	121,8 ± 23,22
ALT (U/L)	40,40 ± 3,92	51,20 ± 3,96***	51,50 ± 3,20***	52,40 ± 2,5***	43,31 ± 4,08
Proteínas Totais	5,2 ± 0,21	5,00 ± 0,40	4,96 ± 0,40	5,22 ± 0,19	5,22 ± 0,10

Valores representam a média ± desvio padrão da média (n = 5/grupo). AST: aspartatoaminotransferase, ALT:alanina-aminotransferase. Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Tukey, *p <0,05; ***p<0,001)

A creatinina é o biomarcador mais utilizado para avaliação da injúria renal, é um produto residual da creatina e produzida em uma taxa praticamente constante no corpo. Ela é livremente filtrada pelos glomérulos e não é reabsorvida nos túbulos renais, além disso, os níveis séricos da creatinina não são influenciados pela idade, sexo ou dieta (SODRÉ, et al., 2007; SÁ, 2014).

A ureia, principal metabólito derivado da degradação proteica, é 90% excretada pelos rins, e também utilizada como marcador da função renal. Entretanto, apesar de ser livremente filtrada pelo glomérulo, 40% desse produto é reabsorvido pelos túbulos renais, com isso, os níveis plasmáticos da ureia pode subestimar a taxa de filtração glomerular (COSTA et al., 2012)

A elevação desses marcadores (ureia e creatinina) no plasma fornece indícios de sobrecarga renal e insuficiência renal aguda (SODRÉ, et al., 2007). No presente trabalho, o EAFCI não foi capaz de causar alterações significativas nos marcadores de lesão renal, independente do sexo, sugerindo que a administração subaguda do EAFCI não provoca toxicidade renal.

Alterações nos valores séricos das transaminases (AST e ALT) e da fosfatase alcalina são importantes indicadores de lesões no fígado. Vários processos patológicos podem causar perturbações hepáticas e com isso elevar os níveis dessas enzimas, como por exemplo, mudanças induzidas por fármacos (SHARON; CENTER, 1995). A aspartato aminotransferase é encontrada em diversos tecidos como coração, músculos, rins, pâncreas e fígado, é liberada no sangue quando existe algum dano tecidual. A aminotransferase de alanina está presente no citosol e na mitocôndria dos hepatócitos. Quando ocorre um dano hepático, a ALT é logo liberada na circulação sanguínea tornando-a um indicador bastante específico do estado do fígado. AST e ALT podem fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos sofridos pelos hepatócitos (ALHABORI et al., 2002; MILLER: GONÇALVES, 1999;). O presente estudo sugere que o uso do EAFCI de forma subaguda pode causar sobrecarga da função hepática, uma vez que foi observada um aumento significativo da AST e ALT, em ambos os sexos, sugerindo que o composto pode induzir um efeito hepatotóxico que precisa ser

melhor investigado. Pode-se inferir que os taninos encontrados no EAFCI estão relacionados a esse efeito hepatotóxico, uma vez que sugerem que os taninos apresentam duplo efeito, por um lado, beneficiam a saúde devido a seu efeito quimiopreventivo contra carcinogênese ou atividades antimicrobianas, por outro lado, estão envolvidos possivelmente na formação de cânceres, hepatotoxicidade ou efeitos antinutricionais (CHUNG et al., 1998).

A toxicidade sistêmica de uma substância também pode se manifestar por meio de alterações na massa relativa dos órgãos (PIRES JR et al., 2010). A análise macroscópica externa dos órgãos não mostrou alterações na cor ou textura, quando comparados ao grupo controle. A administração do EAFCI não alterou o peso absoluto e relativo dos órgãos dos machos (Tabela 11) e fêmeas (Tabela 12) em relação ao grupo controle.

Tabela 11: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre o massa absoluta (g) e relativa (%) dos órgãos de camundongos *Mus musculus* machos tratados por 28 dias consecutivos.

Órgãos	Controle	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg	Satélite
Fígado (g)	2,48 ± 0,15	2,18 ± 0,17	2,09 ± 0,28	2,54 ± 0,19	2,30 ± 0,28
Fígado (%)	5,64 ± 0,48	5,51 ± 0,61	6,00 ± 0,63	6,06 ± 0,17	5,89 ± 0,24
Rim (g)	0,26 ± 0,06	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,03
Rim (%)	0,60 ± 0,15	0,50 ± 0,01	0,64 ± 0,06	0,62 ± 0,08	0,63 ± 0,07
Baço (g)	0,34 ± 0,07	0,29 ± 0,10	0,30 ± 0,10	0,32 ± 0,09	0,32 ± 0,02
Baço (%)	0,83 ± 0,21	0,81 ± 0,37	0,89 ± 0,36	0,79 ± 0,17	0,81 ± 0,35

Valores representam a média ± desvio padrão da média (n = 5/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey

Tabela 12: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre massa absoluta (g) e relativa (%) dos órgãos de camundongos *Mus musculus* fêmeas tratados por 28 dias consecutivos.

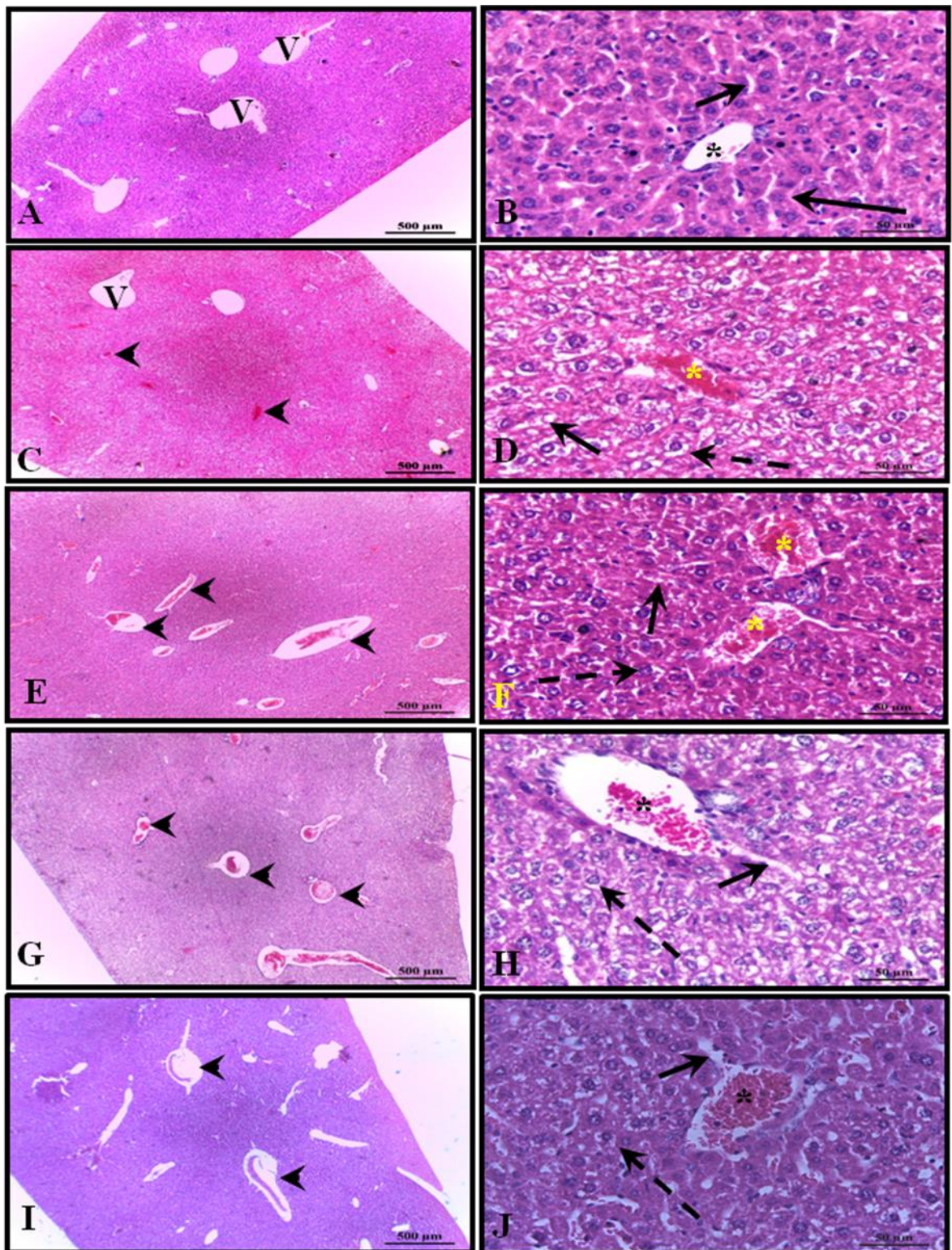
Órgãos	Controle	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg	Satélite
Fígado (g)	2,48 ± 0,3	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,3	2,5 ± 0,18	2,4±0,28
Fígado (%)	5,25 ± 0,51	5,45 ± 0,06	5,79 ± 0,59	5,61 ± 0,74	5,23 ± 0,48
Rim (g)	0,25 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,20 ±0,01
Rim (%)	0,55 ± 0,06	0,58 ± 0,09	0,64 ± 0,06	0,59 ± 0,09	0,60 ± 0,04
Baço (g)	0,24 ± 0,03	0,27 ± 0,05	0,23 ± 0,03	0,28 ± 0,04	0,23 ± 0,02
Baço (%)	0,56 ± 0,09	0,66 ± 0,17	0,52 ± 0,07	0,64 ± 0,01	0,55 ± 0,06

Valores representam a média ± desvio padrão da média (n = 5/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey

No exame histopatológico do fígado dos animais dos grupos controle (machos e fêmeas) foi encontrada externamente uma delgada cápsula composta de tecido conjuntivo fibroso, um parênquima bem desenvolvido e com uma malha vascular com veias centro lobulares de vários calibres. Os hepatócitos apresentaram morfologia poliédrica, núcleo central, nucléolo proeminente e citoplasma acidófilo. No entanto, nos fígados dos animais dos grupos tratados (machos e fêmeas) com extrato aquoso de *C. icaco* nas dosagens de 100, 200 e 400 mg/kg, além do grupo satélite observou-se congestão das veias centro lobulares e hepatócitos com citoplasma vacuolado (Fig. 15A – 15J fêmeas e Fig. 16A – 16J machos).

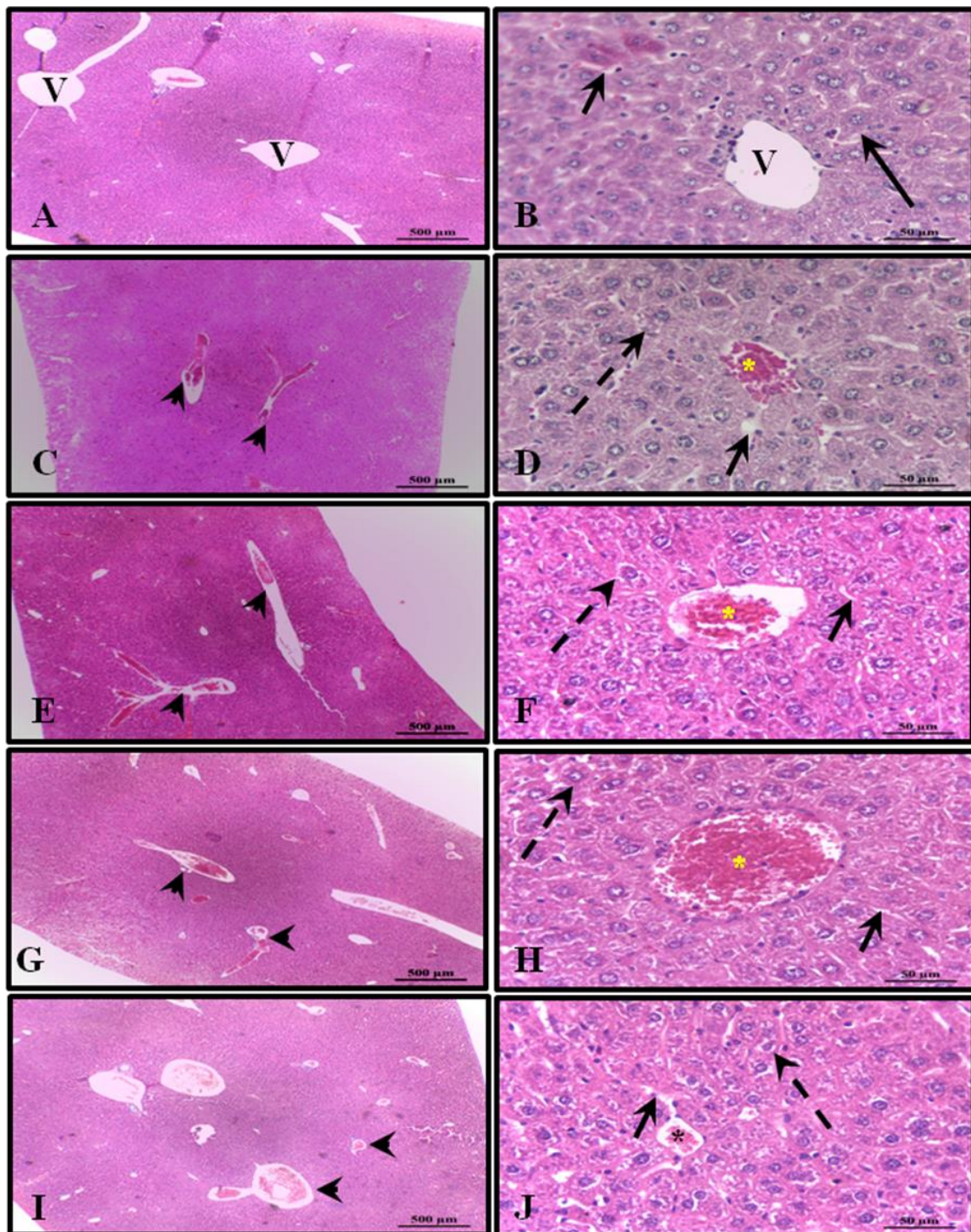
Os rins dos animais dos grupos controle (machos e fêmeas) apresentaram todos os seus componentes estruturais bem definidos, constituindo-se de cápsula fibrosa, região cortical e medular. Observou-se cápsula de Bowman e espaço capsular bem diferenciado, além de glomérulos bem desenvolvidos (Fig. 17A e 17B). No entanto, nos rins dos animais dos grupos tratados (machos e fêmeas) com extrato aquoso de *C. icaco* nas dosagens de 100, 200 e 400mg/kg, além do grupo satélite foram observados glomérulos renais com redução do espaço subcapsular e congestão dos vasos na cortical (Fig. 17C – 17J).

Figura 15: Fotomicrografia dos fígados das fêmeas dos grupos experimentais. (A-B) controle; (C-D) 100mg/kg; (E-F) 200mg/kg; (G-H) 400mg/kg e (I-J) satélite.



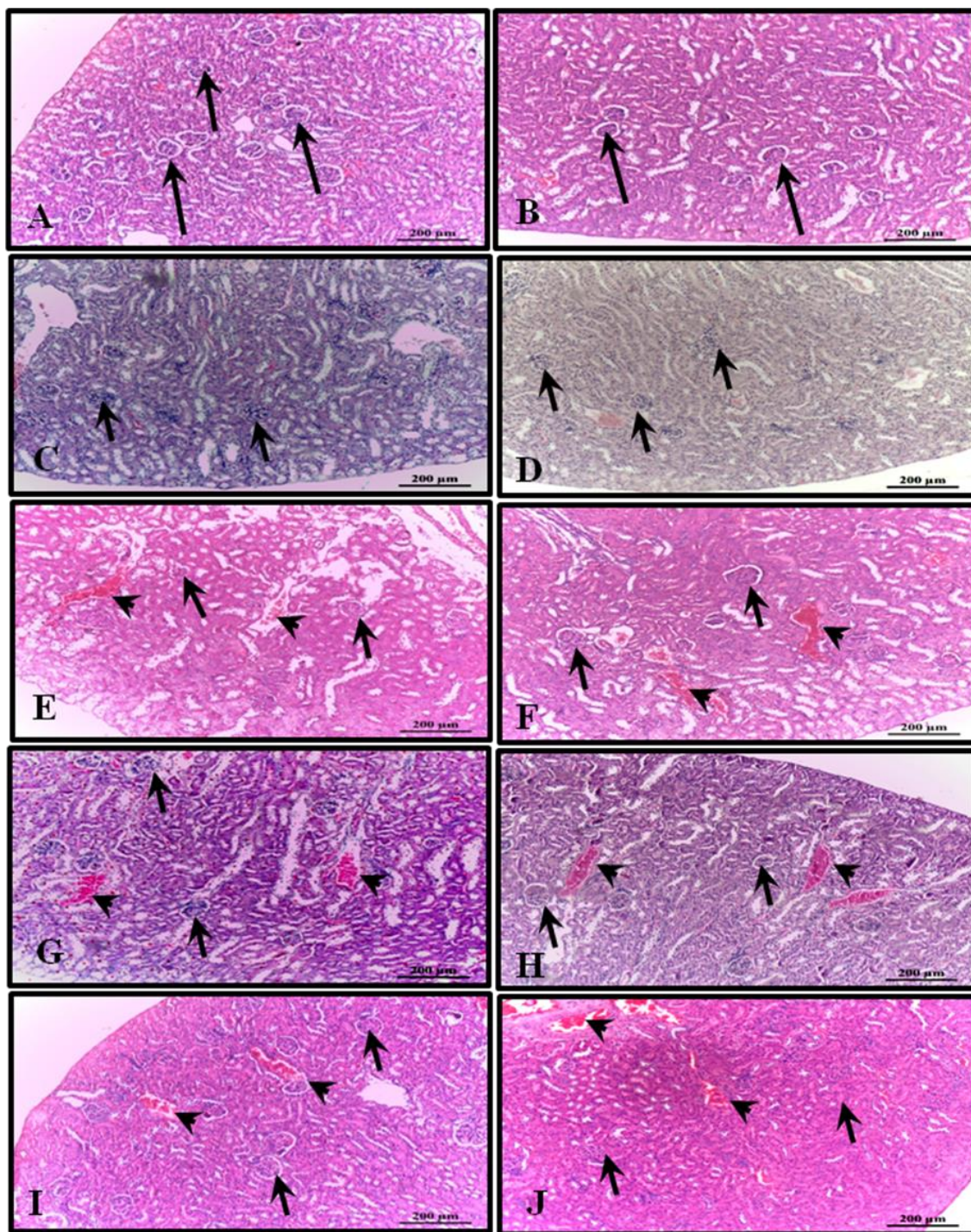
V – veia hepática sem congestão; ponta de setas – veia hepática com congestão; asterisco – veia centro lobular com congestão; seta curta – capilares sinusóides; seta continua – cordões de hepatócitos; seta tracejada – hepatócitos vacuolizados. H.E.

Figura 16: Fotomicrografia dos fígados dos machos dos grupos experimentais. (A-B) controle; (C-D) 100mg/kg; (E-F) 200mg/kg; (G-H) 400mg/kg e (I-J) satélite.



V – veia hepática sem congestão; ponta de setas – veia hepática com congestão; asterisco – veia centro lobular com congestão; seta curta – capilares sinusóides; seta continua – cordões de hepatócitos; seta tracejada – hepatócitos vacuolizados. H.E.

Figura 17: Fotomicrografia dos Rins das fêmeas (A, C, E, G e I) e machos (B, D, F, H e J) dos grupos experimentais. (A-B) controle; (C-D) 100mg/kg; (E-F) 200mg/kg; (G-H) 400mg/kg e (I-J) satélite.



Seta longa – glomérulos normais; ponta de setas – vasos com congestão; seta curta – glomérulos com redução do espaço subcapsular. H.E.

Os aspectos morfométricos do fígado revelaram redução do parênquima lobular e aumento do não lobular nos animais (machos e fêmeas) dos grupos tratados com o extrato aquoso de *C. icaco* e no grupo satélite, quando comparados aos dos animais do grupo controle (Tabelas 13 e 14). Esses achados estão de acordo com o perfil bioquímico apresentado pelos animais nesse presente estudo, reforçando a hipótese de que o uso em doses repetidas do EAFCi pode causar possíveis danos hepáticos.

A análise morfométrica dos rins revelou que houve um aumento no diâmetro e volume dos glomérulos nos animais tratados com o extrato aquoso de *C. icaco* e no grupo satélite em relação ao controle. Não houve alteração significativa no diâmetro e volume da cápsula de Bowman (Tabelas 15 e 16). Apesar de não causar alterações nos marcadores de lesão renal, independente do sexo, pode-se sugerir que a administração do EAFCi provoca uma ligeira nefrotoxicidade, devido ao aumento no diâmetro e volume glomerular (hiperfiltração), deduzindo que o EAFCi provoca alterações na hemodinâmica renal dos animais.

Tabela 13. Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os percentuais do parênquima lobular e não lobular do fígado nas fêmeas dos grupos experimentais.

Grupos	Controle	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg	Satélite
Parênquima lobular	89,43 ± 1,07 ^a	83,56 ± 3,18 ^b	80,44 ± 2,23 ^b	79,34 ± 4,91 ^b	78,42 ± 5,84 ^b
Parênquima não lobular	10,57 ± 1,60 ^b	16,44 ± 2,11 ^a	19,56 ± 4,77 ^a	20,66 ± 2,55 ^a	21,58 ± 3,66 ^a

Os valores apresentam médias ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 14. Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre os percentuais do parênquima lobular e não lobular do fígado nos machos dos grupos experimentais.

Grupos	Controle	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg	Satélite
Parênquima lobular	93,55 ± 3,72 ^a	82,14 ± 2,09 ^b	81,28 ± 1,47 ^b	79,88 ± 3,12 ^b	80,71 ± 5,84 ^b
Parênquima não lobular	6,45 ± 3,03 ^b	17,86 ± 1,65 ^a	18,72 ± 2,62 ^a	20,88 ± 3,83 ^a	19,29 ± 1,52 ^a

Os valores apresentam médias± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 15: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre o diâmetro glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins das fêmeas dos grupos experimentais.

Grupos					
	Controle	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg	Satélite
DG (μm)	117,27 $\pm$ 8,33b	146,11 $\pm$ 11,88a	141,14 $\pm$ 10,20a	157,01 $\pm$ 9,54a	155,70 $\pm$ 10,03a
VG (μm^3)	127,34 $\pm$ 6,61b	147,99 $\pm$ 7,29a	150,00 $\pm$ 5,35a	154,72 $\pm$ 6,56a	152,59 $\pm$ 4,44a
DCB (μm)	155,21 $\pm$ 3,87a	158,15 $\pm$ 4,11a	160,23 $\pm$ 4,63a	158,45 $\pm$ 3,99a	157,09 $\pm$ 3,15a
VCB (μm^3)	161,56 $\pm$ 7,52a	159,31 $\pm$ 6,09a	164,41 $\pm$ 4,92a	162,75 $\pm$ 6,25a	158,83 $\pm$ 7,12a

Os valores apresentam médias $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 16: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg) administrado por via oral sobre do diâmetro glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins dos machos dos grupos experimentais.

	Grupos				
	Controle	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg	Satélite
DG (μm)	120,47 $\pm$ 10,06b	150,26 $\pm$ 7,51a	149,37 $\pm$ 9,11a	151,78 $\pm$ 6,23a	148,70 $\pm$ 8,03a
VG (μm^3)	131,72 $\pm$ 5,236b	152,05 $\pm$ 7,43a	156,16 $\pm$ 4,33a	154,79 $\pm$ 8,44a	150,11 $\pm$ 5,88a
DCB (μm)	161,19 $\pm$ 2,11 ^a	163,17 $\pm$ 1,05a	162,49 $\pm$ 2,06a	164,33 $\pm$ 3,25a	163,09 $\pm$ 1,15a
VCB (μm^3)	162,46 $\pm$ 1,14 ^a	164,34 $\pm$ 5,12a	165,82 $\pm$ 4,61a	164,77 $\pm$ 2,45a	165,39 $\pm$ 3,18a

Os valores apresentam médias $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

6.4 TOXICIDADE REPRODUTIVA

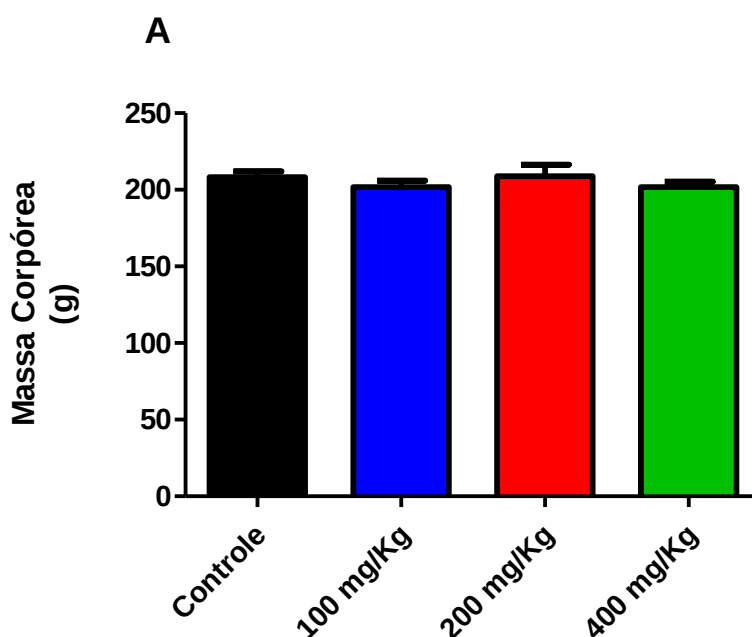
6.4.1 Exposição no período da embriogênese

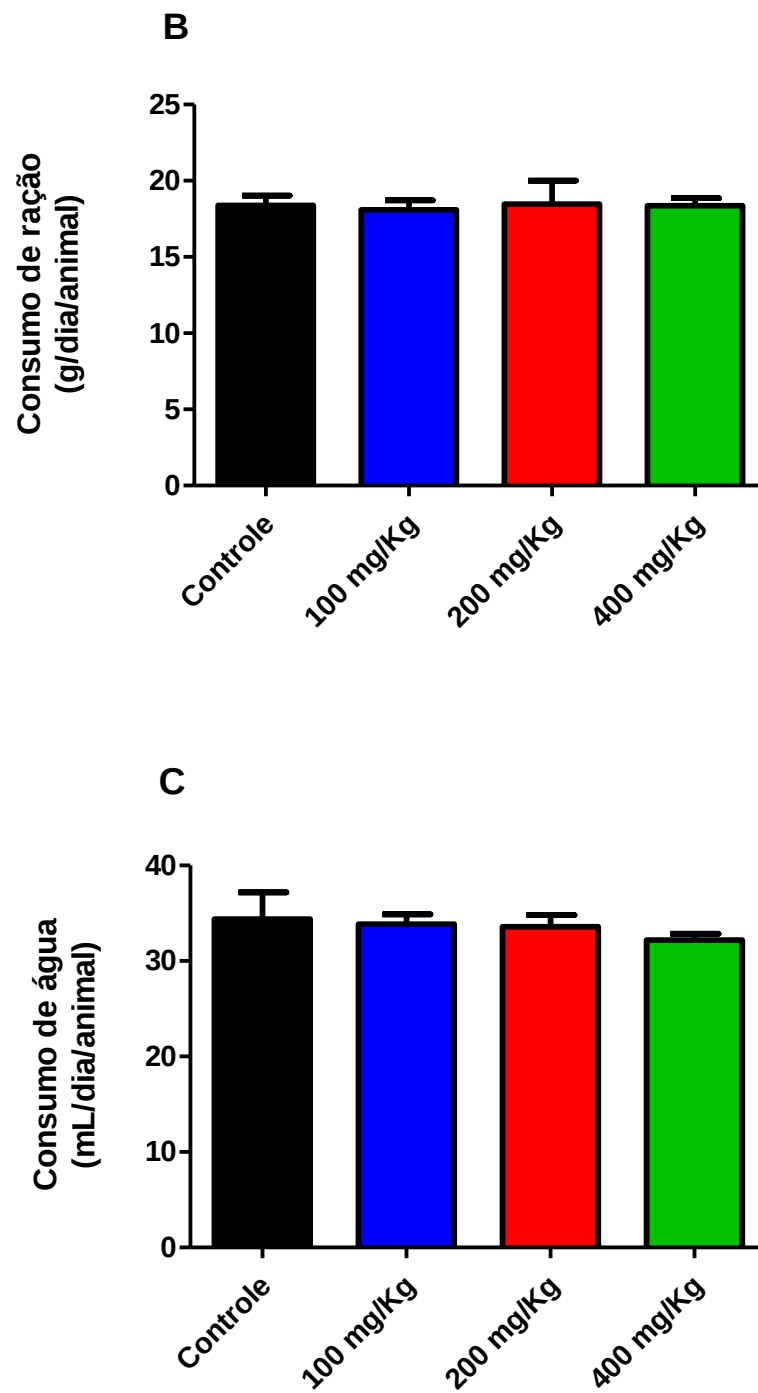
✓ Toxicidade aguda das progenitoras

Durante a gestação, o peso corporal, a ingestão de alimento e o consumo energético podem variar de acordo com o estado fisiológico do animal. A saúde geral das fêmeas no período gestacional fornece informações relevantes a cerca dos efeitos tóxicos reprodutivos de uma substância, os parâmetros de observação direta tal como diarreia, piloereção, apatia, agressividade, bem como a avaliação indireta (redução no ganho de massa corpórea e ingestão de alimento) durante essa fase, pode ser um indicador importante de toxicidade sistêmica (CALLIARI-MARTIN et al. 2001)

A administração das diferentes doses (100, 200 e 400 mg/kg) do EAFCi durante o período de pré-implantação (1º ao 6º dia de prenhes) não interferiu na massa corporal das progenitoras (Figura 18A). A ingestão de água e ração também não foi alterada nos grupos testados (Figura 18B e 18C).

Figura 18: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFCi) na massa corpórea de ratas Wistar (A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) tratados por via oral durante o período embriogênese (1º ao 6º dia de prenhez).





Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. ($n = 10/\text{grupo}$). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey

A toxicidade reprodutiva de uma substância química também pode ser avaliada através da medida da massa de órgãos reprodutivos. Quaisquer alterações na massa absoluta e relativa fornecem evidências do potencial toxicológico da substância no sistema reprodutor.

A administração do EAFCi nas doses de 100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 400 mg/Kg, não alterou a massa absoluta e relativa dos órgãos reprodutivos (útero e ovários) e de outros órgãos como o fígado, rins, baço, adrenais, pulmão e coração das progenitoras (Tabela 17). Com base nesses resultados pode-se sugerir que o EAFCi não provocou toxicidade materna durante exposição.

Tabela 17: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre o massa absoluta (g) e relativa (%) dos órgão de ratas Wistar tratadas durante o período da embriogênese (1º ao 6º dia de prenhez).

Órgãos	Controle	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg
Fígado (g)	11,22 ± 2,07	11,36 ± 1,43	11,09 ± 0,80	11,96 ± 1,82
Fígado (%)	4,42 ± 0,62	3,67 ± 0,27	3,83 ± 0,28	3,58 ± 0,32
Rim (g)	1,54 ± 0,15	1,47 ± 0,22	1,54 ± 0,21	1,44 ± 0,16
Rim (%)	0,54 ± 0,05	0,49 ± 0,04	0,49 ± 0,06	0,49 ± 0,03
Baço (g)	0,82 ± 0,11	0,72 ± 0,10	0,79 ± 0,10	0,79 ± 0,09
Baço (%)	0,23 ± 0,30	0,22 ± 0,03	0,20 ± 0,05	0,24 ± 0,02
Coração (g)	0,78 ± 0,08	0,77 ± 0,15	0,77 ± 0,08	0,76 ± 0,07
Coração (%)	0,28 ± 0,04	0,24 ± 0,00	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,01
Pulmões (g)	1,17 ± 0,17	1,38 ± 0,15	1,46 ± 0,18	1,44 ± 0,16
Pulmões (%)	0,51 ± 0,08	0,53 ± 0,22	0,49 ± 0,03	0,46 ± 0,05
Adrenais (g)	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Adrenais (%)	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Ovários (g)	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Ovários (%)	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00
Útero (g)	0,94 ± 0,15	0,94 ± 0,12	0,95 ± 0,08	0,91 ± 0,14
Útero (%)	0,46 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,47 ± 0,03	0,45 ± 0,01

Valores representam a média ± desvio padrão da média (n = 10/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

✓ Parâmetros reprodutivos das progenitoras

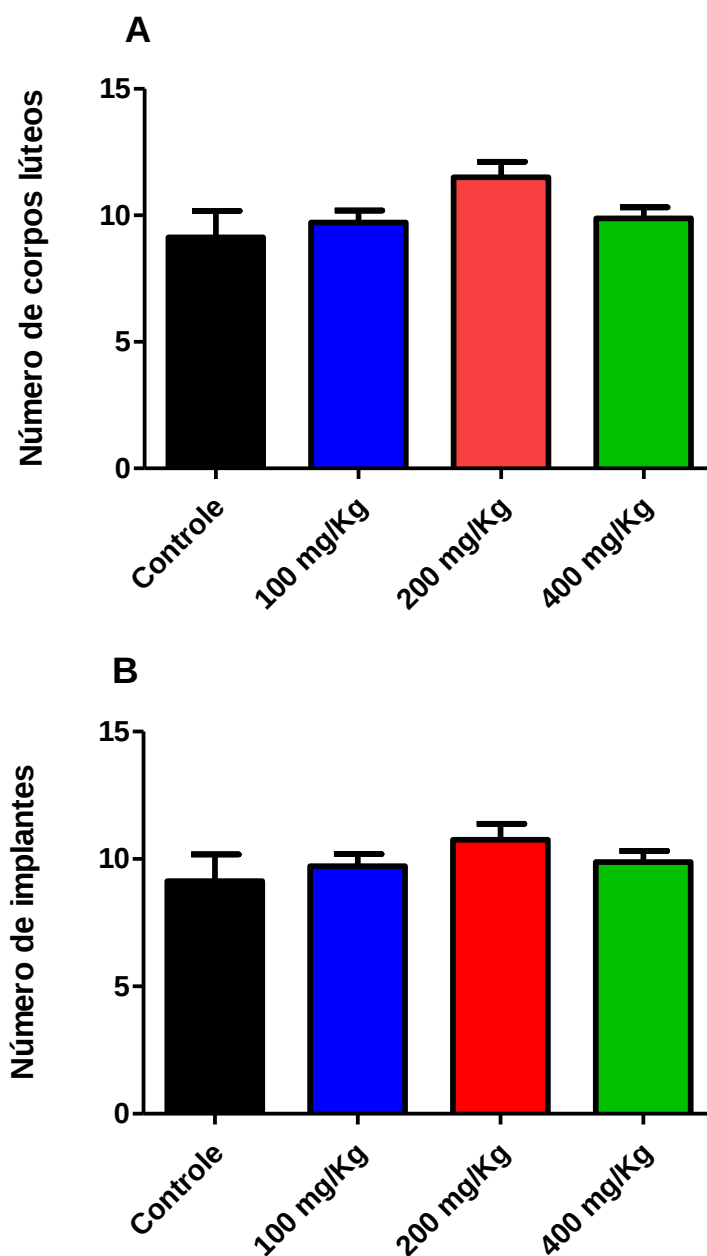
Vários xenobióticos podem atuar durante o período da gestação e provocar perdas pré- e pós-implantação, retardo no desenvolvimento, malformações e até morte fetal. É durante o processo de implantação que o embrião estabelece uma íntima relação com o endométrio materno e a gestação é estabelecida. Uma característica peculiar dessa fase é o desenvolvimento do embrião para estágio de blastocisto, onde as células indiferenciadas encontram-se em bastante divisão mitótica (GOPINATH, 2013).

Nos mamíferos, o sucesso da gestação depende da manutenção dos níveis de progesterona e estrogênio. O corpo lúteo constitui-se a fonte primária desses hormônios, eles são bastante importantes no processo de preparação da mucosa uterina para receber o embrião (SADLER, 2010). No presente estudo; o EAFCi não alterou o número de corpos lúteos das progenitoras em relação o controle (Figura 19A). Consequentemente, não houve diferença no número de sítio de implantação das ratas do grupo experimental em comparação ao grupo controle (Figura 19B).

De acordo com Almeida (2000), a taxa de perda de pré-implantação é o principal parâmetro avaliado no período da embriogênese, pois ela estabelece a correlação entre o número de ovócitos liberados e aqueles que, após fecundados, conseguiram implantar no útero (ALMEIDA; LEMONICA, 2000, CHANG et al., 2002).

Não foram observadas perdas pré-implante entre as progenitoras dos grupos tratados com EAFCi. Os cálculos das perdas embrionárias (nº de corpos lúteos – nº de implantações) revelaram a ausência de efeitos tóxicos reprodutivos do EAFCi, sugerindo uma capacidade normal de desenvolvimento dos blastocistos implantados.

Tabela 19: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre o número de sítio de implantações de ratas Wistar tratadas durante o período da embriogênese (1º ao 6º dia de prenhez).

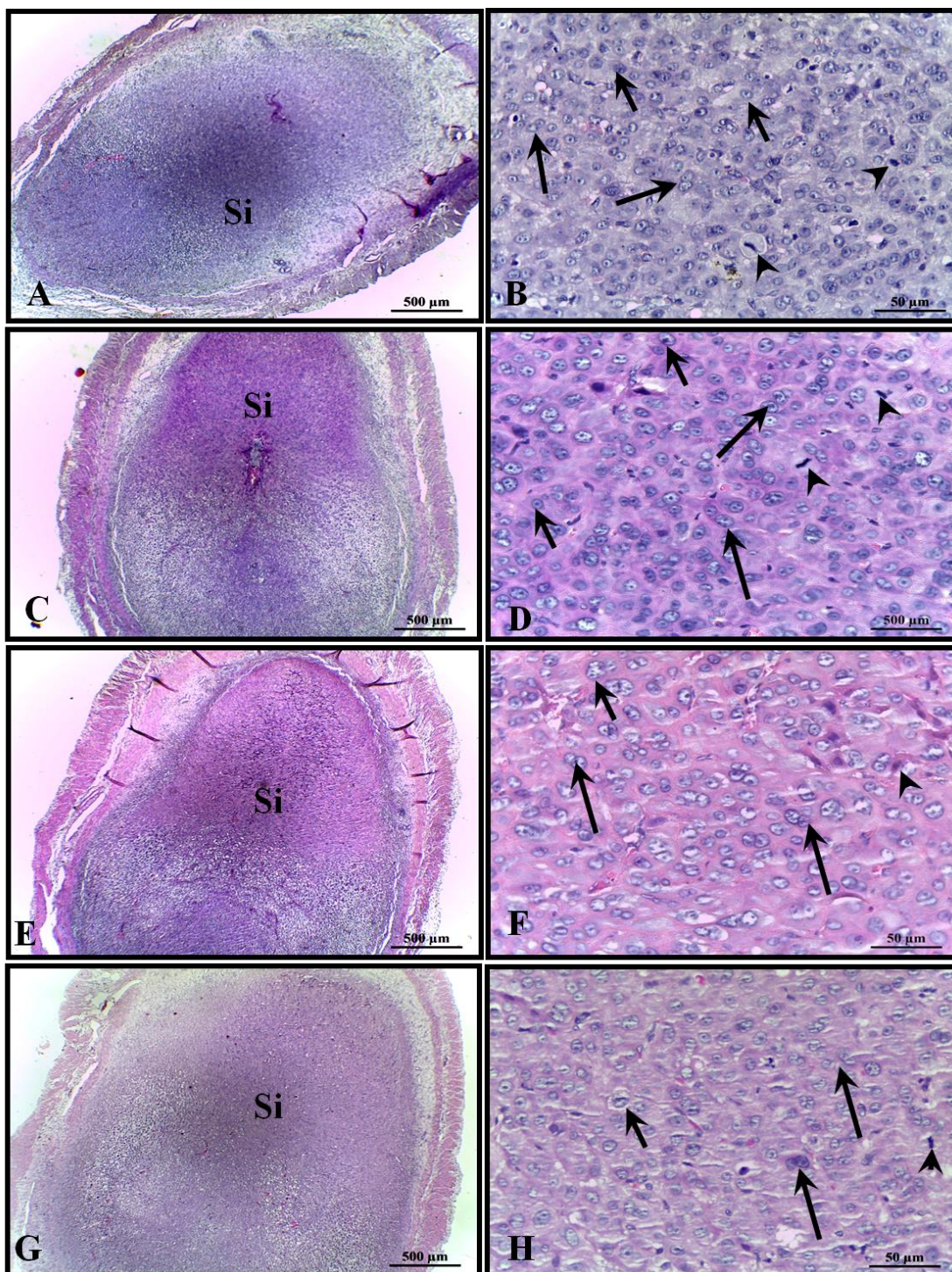


Dados apresentados com média $\pm$ d.p.m (n=10/ grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey

✓ Histopatologia do sítio de implantação

Histologicamente os sítios de implantação em todos os grupos experimentais apresentaram-se bem preservados, totalmente inseridos na parede do útero, bastante desenvolvidos (Fig. 20A - 20G). Foi possível evidenciar ainda citotrofoblastos e vários trofoblastos em mitose (Fig. 20B - 20H).

Figura 20: Fotomicrografia da parte do útero de ratas mostrando os sítios de implantação dos animais dos grupos experimentais. (A-B) controle; (C-D) 100mg/kg; (E-F) 200 mg/kg e (G-H) 400mg/kg.



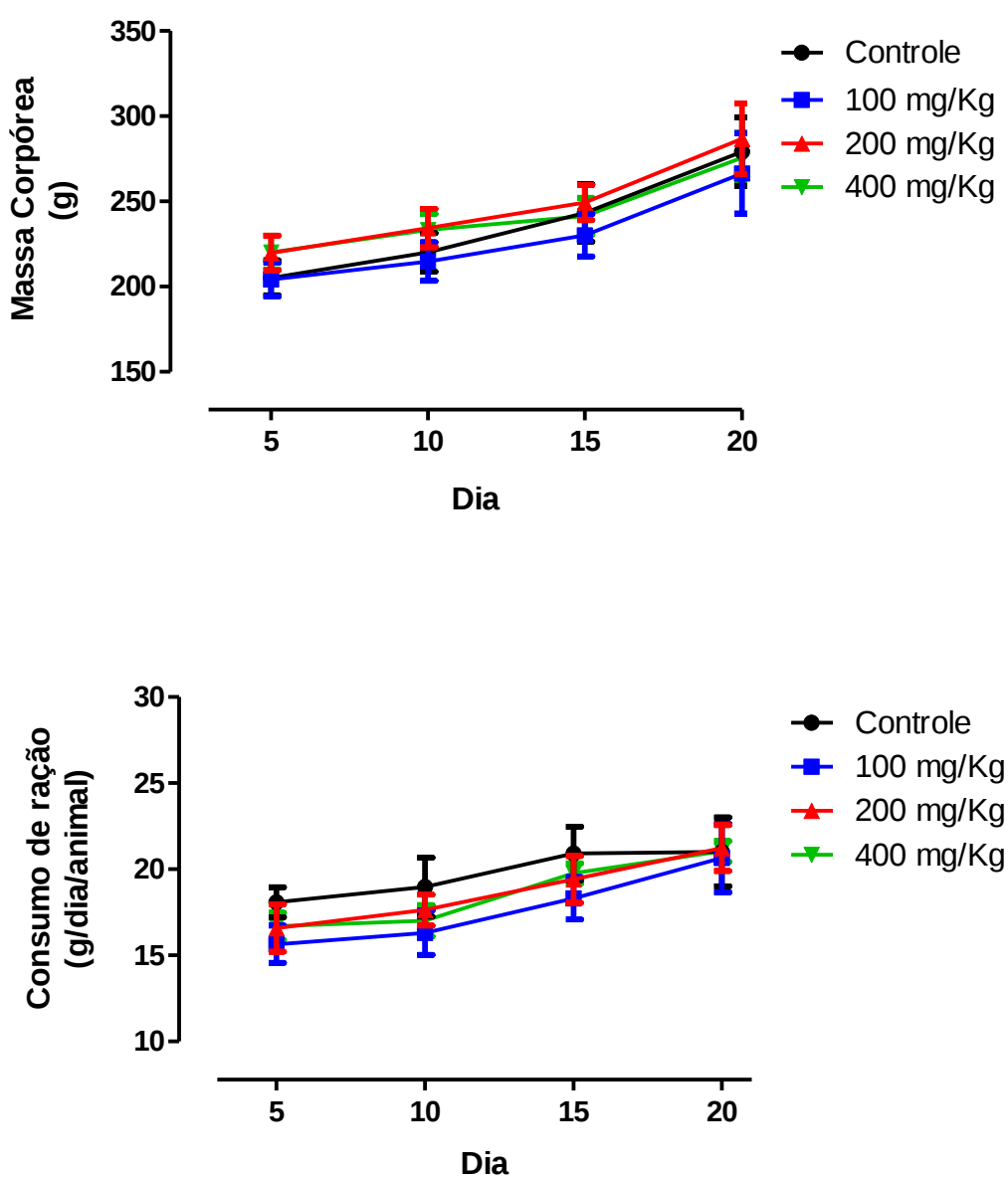
Seta longa: Citotrofoblasto; Ponta de seta: Trofoblasto em mitose. H-E.

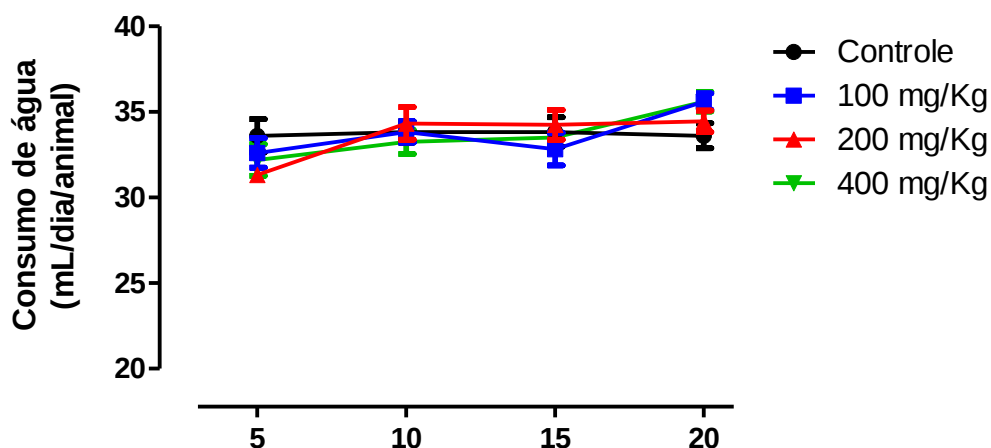
6.4.2 Exposição no período de organogênese

✓ Toxicidade aguda das progenitoras

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com o EAFCi não interferiu na massa corpórea (Figura 21A), no consumo de ração (Figura 21B) e no consumo de água (Figura 21C) das progenitoras. Também não foram observados sinais clínicos de toxicidade como piloereção, diarreia, salivação, sangramento e morte, assim como no período de pré-implantação.

Figura 21: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFCi) na massa corpórea de ratas Wistar (A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) tratados por via oral durante o período organogênese (6º ao 15º dia de prenhez).





Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. (n= 10/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey

A massa absoluta e relativa dos órgãos (fígado, rins, baço, pulmão, coração e ovários) das progenitoras exposta ao EACi durante o período da organogênese, não diferiram do grupo controle (Tabela 18), nenhum sinal macroscópico (textura e cor) de toxicidade foi observado nos grupos estudados.

Diante do exposto, pode-se sugerir que a administração do EAFCi nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg em ratas prenhes durante o período da organogênese, não provoca nenhum efeito tóxico sistêmico sobre a fisiologia materna (consumo de água, ração e massa corporal).

Tabela 18: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/Kg), por via oral sobre amassa absoluta (g) e relativa (%) dos órgão de ratas Wistar tratados durante o período da embriogênese (6º ao 15º dia de prenhes).

Órgãos	Controle	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg
Fígado (g)	12,98 ± 1,37	11,17 ± 0,77	12,36 ± 0,94	11,06 ± 1,26
Fígado (%)	4,42 ± 0,62	3,67 ± 0,27	3,83 ± 0,28	3,58 ± 0,32
Rim (g)	1,60±0,19	1,51 ± 0,14	1,58 ± 0,10	1,33 ± 0,52
Rim (%)	0,54 ± 0,05	0,49 ± 0,04	0,49 ± 0,06	0,49 ± 0,03
Baço (g)	0,70 ± 0,09	0,68 ± 0,12	0,65 ± 0,24	0,76 ± 0,10
Baço (%)	0,23 ± 0,30	0,22 ± 0,03	0,20 ± 0,05	0,24 ± 0,02
Coração (g)	0,84 ± 0,18	0,74 ± 0,03	0,83 ± 0,08	0,80 ± 0,06
Coração (%)	0,28 ± 0,04	0,24 ± 0,00	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,01
Pulmões (g)	1,53 ± 0,27	1,62 ± 0,22	1,61 ±00,10	1,22 ± 0,54
Pulmões (%)	0,51 ± 0,08	0,53 ± 0,22	0,49 ± 0,03	0,46 ± 0,05
Adrenais (g)	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Adrenais (%)	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00

Valores representam a média ± desvio padrão da média (n = 10/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey

✓ Parâmetros reprodutivos

Após a laparotomia, no 21º dia de gestação, foi avaliado o número de fetos vivos e mortos, número de implantações, taxa de perdas pós-implantação, número de reabsorções prévias e tardias, número de corpos lúteos e massa absoluta e relativa dos ovários.

Níveis inadequados de hormônios maternos, principalmente da progesterona, acarretam em prejuízos no desenvolvimento embrionário. Amassa dos ovários e o número de corpos lúteos são medidas indiretas da viabilidade hormonal de progesterona materna.

Outras medidas que se relacionam de forma direta com o período da organogênese são a taxa de perdas pós-implantação e a reabsorção prévia e tardia (GOPINATH, 2013). No presente estudo, foi observado que o tratamento nas diferentes doses testadas não afetou os parâmetros gestacionais analisados em comparação as ratas que receberam água (Tabela 19). Dessa forma, os dados apontam que o EAFCi não apresenta efeitos tóxicos sobre o organismo embriofetal.

Tabela 19: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/Kg), por via oral sobre os parâmetros reprodutivos de ratas Wistar tratadas durante o período da organogênese (6º ao 15º dia de prenhes).

Parâmetros Reprodutivos	Controle	100 mg/Kg	200 mg/Kg	400 mg/Kg
Ratas prenhes	10	10	9	10
Número de fetos vivos	10,6 ± 0,89	10,8 ± 1,23	10,66 ± 0,57	10,0 ± 1,00
Número de fetos mortos	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Números de Implantações	9,6 ± 0,54	10,6 ± 1,14	10,7 ± 1,25	9,1 ± 1,16
Números de corpos lúteos	9,6 ± 0,54	10,6 ± 1,14	10,7 ± 1,25	9,1 ± 1,16
Número de reabsorções prévias	0,25 ± 0,46	0,14 ± 0,34	0,14 ± 0,34	0,14 ± 0,34
Número de reabsorções tardias	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Massa Absoluta dos ovários (g)	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,03
Massa Relativa dos ovários (%)	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01
Taxa de perdas pós-implantação	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

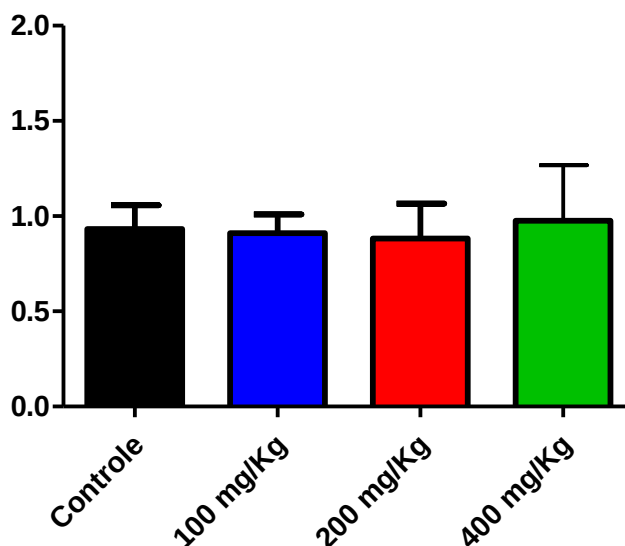
Valores representam a média ± desvio padrão da média (n = 10/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey para número de fetos vivos e mortos e massa dos ovários e Kruskal-Wallis para número de implantações e reabsorções e taxas de perdas pós-implantação.

✓ Embriofetotoxicidade

Durante o desenvolvimento (período entre a concepção e o nascimento), vários fatores podem provocar toxicidade fetal, como agentes químicos, físicos e ambientais (BARROS; DAVINO, 2008). A oferta adequada de nutriente através da placenta está diretamente ligada ao desenvolvimento fetal no ambiente uterino, pois a diminuição no tamanho placentário promove uma maior incidência de sofrimento fetal (DUARTE et al., 2014). Sendo assim, a massa fetal, massa placentária e o índice placentário (peso de feto produzido por peso de placenta) são parâmetros importantes na avaliação da embriofetotoxicidade. No presente estudo, foi observado que a massa corporal dos fetos, massa placentária e o índice placentário não foram afetados pela administração do EAFCi (Tabela 20).

A razão sexual (razão entre a quantidade de machos e fêmeas na mesma ninhada) é outro parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a embriofetotoxicidade (OECD, 2015). Apesar de o processo de diferenciação gonadal começar no 13º dia após a fertilização, o desenvolvimento da genitália externa só ocorre por volta do 18º dia (MAGRE; VIGIER, 2001). A exposição a agentes tóxicos durante a organogênese pode retardar o desenvolvimento e/ou a diferenciação sexual dos animais. No presente estudo, não ocorreu diferença na razão sexual das proles de ratas submetidas ao EAFCi (Figura 22)

Figura 22: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre a razão sexual de ratas Wistar tratadas durante o período da organogênese (6º ao 15º dia de prenhes).



Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. (n = 10/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey

Tabela 20: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre os parâmetros reprodutivos de ratas Wistar tratadas durante o período da organogênese (6º ao 15º dia de prenhez).

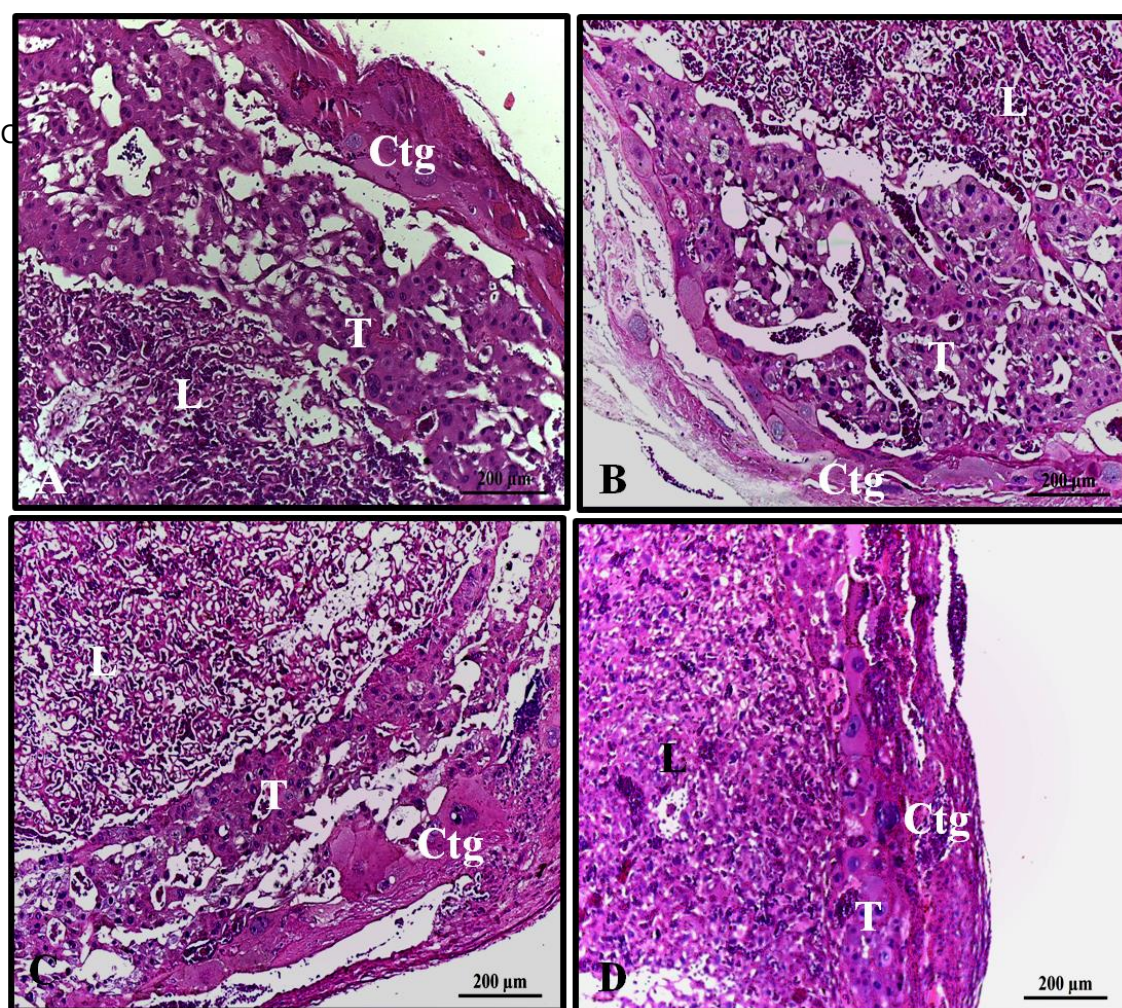
Embriofetotoxicidade	Controle	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Massa Corpórea dos machos (g)	5,21 ± 0,49	5,61 ± 0,29	5,66 ± 0,36	5,56 ± 0,31
Massa Corpórea das fêmeas (g)	5,15 ± 0,35	5,20 ± 0,38	5,44 ± 0,54	5,27 ± 0,21
Massa das placentas	5,01 ± 0,72	5,03 ± 0,91	5,21 ± 0,74	4,88 ± 0,76
Índice placentário	1,20 ± 0,30	1,10 ± 0,20	1,08 ± 0,26	1,17 ± 0,21

Os valores representam as médias ± d.p.m. (n = 10/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey

✓ Histopatologia da placenta

O disco placentário em todos os grupos experimentais apresentou-se bem desenvolvido contendo as camadas do labirinto, trofospôgio e células trofoblásticas gigantes bem características. Na camada do labirinto, região mais externa e a mais espessa, caracterizada pela presença de numerosas lacunas contendo vasos maternos e fetais. Na camada do trofospôgio observaram-se trofoblastos indiferenciados. A última camada é formada pelas células trofoblásticas gigantes, as quais se misturam com a decídua (Fig. 23A - 23D).

Figura 23: Fotomicrografia das placentas dos animais dos grupos experimentais. (A) controle; (B) 100mg/kg; (D) 200 mg/kg e (G-H) 400mg/kg



ctg: Citotrofoblasto; T: Trofoblasto. H-E.

✓ Análise morfométrica placentária

A análise morfométrica revelou que apenas nos animais que receberam a dosagem de 400mg/kg do extrato aquoso de *C. icaco* as placentas apresentaram redução significativa da área total do disco placentário e de suas camadas. Sem, no entanto, diferirem em relação a quantificação dos seus constituintes (Tabelas 21,22, 23 e 24). Essa redução pode estar relacionada com a atividade antiangiogênica observada no EAF*ci*, uma vez que a angiogênese é necessária para encaminhar nutrientes e oxigênio para os tecidos, com isso o efeito antiangiogênico do extrato pode ter ocasionado falta de nutrição e conseqüentemente atrofia placentária.

Tabela 21: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre as medidas das áreas (μm^2) total do disco placentário dos animais dos grupos experimentais.

Grupos			
Controle	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg
309,32 $\pm$ 17,39a	299,54 $\pm$ 12,87 ^a	306,26 $\pm$ 10,68a	254,21 $\pm$ 14,58b

Os valores apresentam médias $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 22: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre as medidas das áreas (μm^2) das camadas do disco placentário dos animais dos grupos experimentais.

Camadas	Grupos			
	Controle	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg
Labirinto	133,50 $\pm$ 7,14 ^a	130,77 $\pm$ 5,98a	129,32 $\pm$ 8,69a	101,73 $\pm$ 5,12b
Trofospongio	91,09 $\pm$ 4,45 ^a	89,37 $\pm$ 3,05a	90,82 $\pm$ 5,15a	68,19 $\pm$ 6,76b
Células Trofoblásticas Gigantes	23,15 $\pm$ 1,17 ^a	22,60 $\pm$ 2,10a	22,16 $\pm$ 2,84a	18,93 $\pm$ 1,00b

Os valores apresentam médias $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 23: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre a contagem dos elementos da região do labirinto do disco placentário dos animais dos grupos experimentais.

Camadas	Grupos			
	Controle	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg
Trofoblasto sincicial	16,20 $\pm$ 4,92a	14,53 $\pm$ 5,34a	12,47 $\pm$ 6,61a	11,06 $\pm$ 3,31a
Parede dos vasos fetal	21,1 $\pm$ 5,30a	19,45 $\pm$ 1,69a	20,12 $\pm$ 3,14a	18,23 $\pm$ 5,81a
Lúmen dos vasos fetal	46,3 $\pm$ 13,26a	42,22 $\pm$ 11,87a	39,68 $\pm$ 12,01a	48,26 $\pm$ 3,16a
Vaso materno	16,6 $\pm$ 7,89a	15,43 $\pm$ 9,17a	14,98 $\pm$ 7,77a	17,36 $\pm$ 6,95a

Os valores apresentam médias $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 24: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*Ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre a contagem dos elementos da região do trofospôgio do disco placentário dos animais dos grupos experimentais.

Grupos				
Camadas	Controle	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg
Vascularização materna	14,43 ± 3,65a	13,98 ± 2,02a	11,54 ± 3,21a	15,39 ± 2,76a
Céls. trofoblásticas indiferenciadas	8,11 ± 1,03a	9,44 ± 1,72a	7,48 ± 2,90a	8,31 ± 2,12a
Células intermediárias	5,30 ± 1,20a	3,18 ± 1,57a	4,47 ± 2,65a	4,07 ± 3,83a
Células trofoblásticas gigantes	1,62 ± 0,19a	1,13 ± 0,14a	0,99 ± 1,95a	1,01 ± 0,75a
Células sinciciais	0,52 ± 0,06a	0,49 ± 0,17a	0,50 ± 0,11a	0,50 ± 0,13a
Mesenquima	75,34 ± 9,33a	70,69 ± 6,66a	73,71 ± 4,49a	71,03 ± 4,80a

Os valores apresentam médias ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

✓ Teratogenicidade

Durante o período gestacional, a exposição materna a agentes tóxicos pode afetar a função placentária e/ou promover alterações no desenvolvimento fetal, ocasionando anomalias e malformações do concepto (MOORE; PERSAUD, 2008). A administração do EAF*Ci* não causou malformações e anomalias (externa e interna) nos filhotes analisados (Tabela 25).

Tabela 25: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFCi 100, 200 e 400 mg/Kg), por via oral sobre as malformações e anomalias externas e internas (esquelética e visceral) da prole de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia).

		Controle	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Malformações externas	Ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10	0/10
	Fetos Afetados	0/113	0/103	0/100	0/95
Anomalias externas	Ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10	0/10
	Fetos afetados	0/113	0/103	0/100	0/95
Alterações esqueléticas	Ninhadas afetadas	2/10	3/10	3/10	2/10
	Fetos Afetados	4/56	5/53	4/50	4/46
Anomalias esqueléticas	Ninhadasafetadas	0/10	0/10	0/10	0/10
	Fetos Afetados	0/113	0/103	0/100	0/102
Anomalias viscerais	Ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10	0/10
	Fetos Afetados	0/113	0/103	0/100	0/102
Alterações viscerais	Ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10	0/10
	Fetos Afetados	0/55	0/50	0/50	0/45

Os valores representam as médias $\pm$ d.p.m. (n = 10/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis.

Na análise diferencial das anomalias e malformações esqueléticas, foi possível evidenciar algumas alterações como: agenesia das falanges proximais posteriores nos grupos que receberam 100 e 400 mg/kg do EAFCi (Figura 24) esternóbrio em borboleta de fetos cujas mães foram tratadas com 100 mg/Kg (Figura 25), agenesia de vértebras caudais em todos os grupos tratados (Figura 26), costelas onduladas (Figura 27). Embora diagnosticadas, essas alterações não apresentaram diferenças estatística em relação ao grupo controle (tabela 26).

Figura 24: Feto do grupo controle com falanges normais (A). Feto do grupo EAFCi com agenesia de falanges posteriores (B).

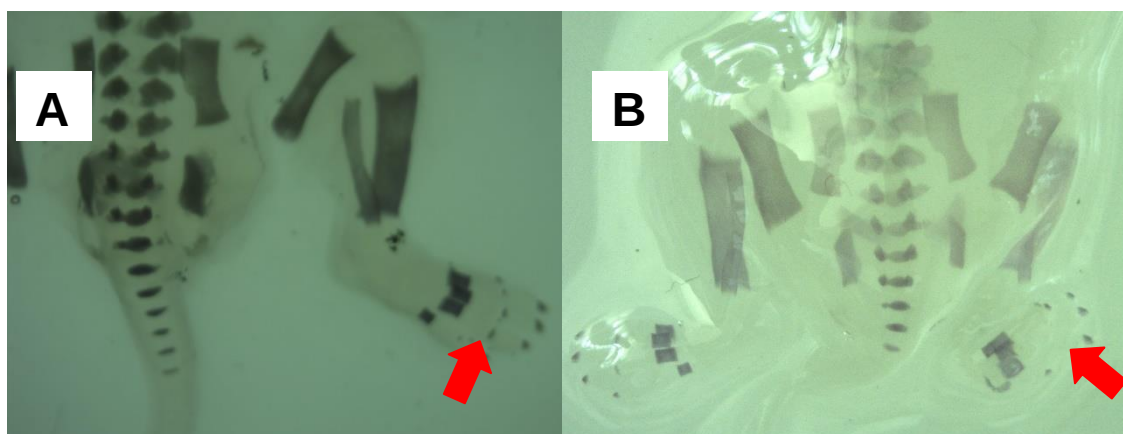


Figura 25: Feto do grupo controle com esternóbrio normal (A). Feto do grupo EAFCi com esternóbrio em borboleta (B).

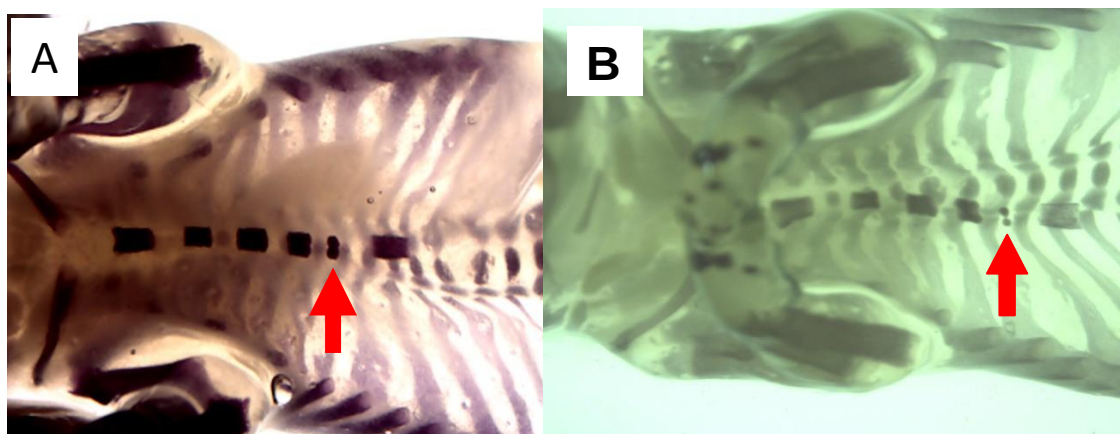


Figura 26: Feto do grupo controle com as vertebrae caudais normais (A). Feto do grupo EAFCi com agenesia de vértebras caudais (B).

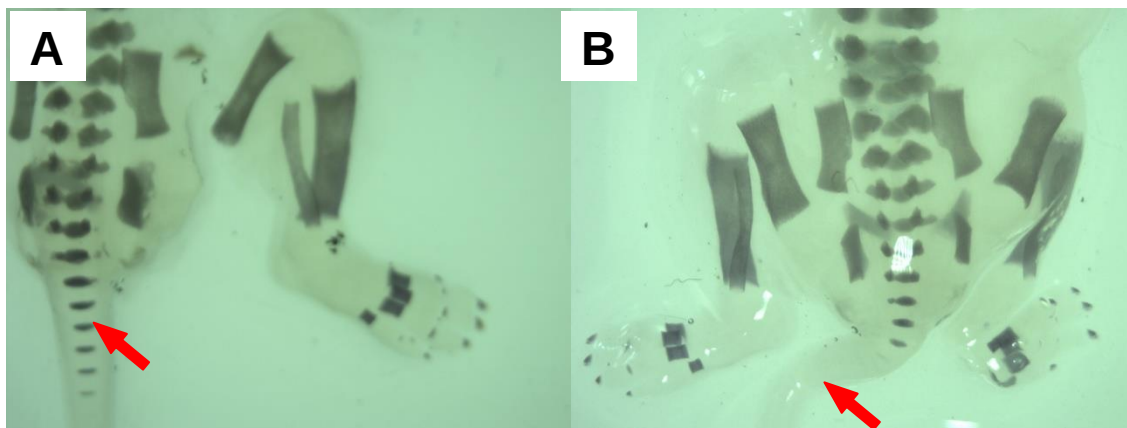


Figura 27: Feto do grupo controle com costelas normais (A). Feto do grupo EAFCi com costelas onduladas (B).

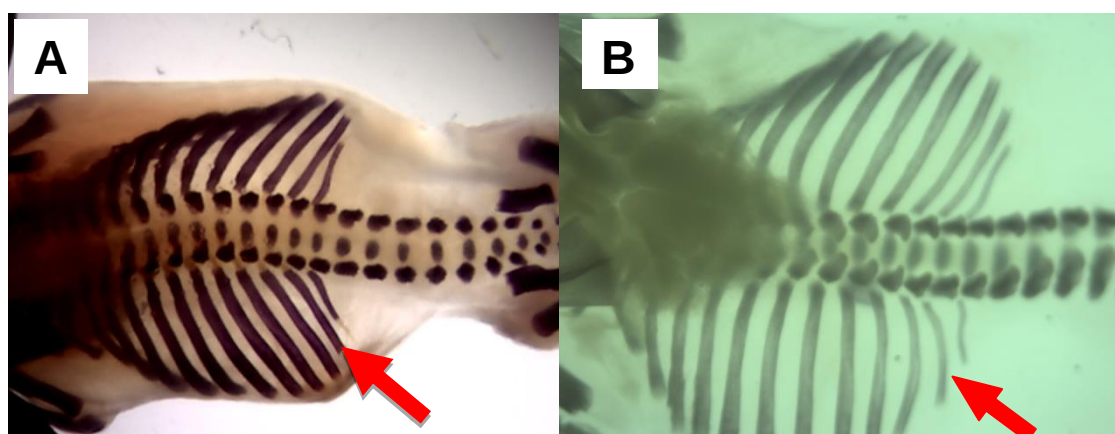


Tabela 26: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAF*ci* 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre as alterações esqueléticas da prole de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia).

Alterações esqueléticas	Controle	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Agenesia de Falanges Posteriores	2/56	2/53	1/50	2/46
Agenesia do Esternébrio	0/56	0/53	0/50	0/46
Agenesia de Vértabras Caudais	2/56	3/53	2/50	2/46
Fontanela aumentada	0/56	0/53	0/50	0/46
Costelas Onduladas	0/56	0/53	1/50	0/46

Os valores representam média $\pm$ d.p.m (n=10/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis.

A toxicidade materna pode interferir diretamente no peso fetal, entretanto esse parâmetro não é o mais indicado em estudos de desenvolvimento fetal, uma vez que ele pode variar dependendo do tamanho da ninhada. Por esse motivo, foi realizada a quantificação dos pontos de ossificação fetal, pois está intimamente ligado a taxa de crescimento fetal (CARNEY; KIMMEL, 2007). Os valores encontrados para os pontos de ossificação dos fetos de ratas tratadas com EAFCi não foram diferentes dos animais controle e estavam dentro dos valores de referência para a espécie, corroborando com a não alteração no crescimento fetal (Tabela 27).

Tabela 27: Efeito do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* (EAFCi 100, 200 e 400 mg/kg), por via oral sobre os pontos de ossificação da prole de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia).

	Controle	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Esternébrio	6,00± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00± 0,00	6,00± 0,00
FalangesPosteriores	4,00± 0,00	4,00± 0,00	4,00± 0,00	4,00± 0,00
FalangesAnteriores	4,00± 0,00	4,00± 0,00	4,00± 0,00	4,00± 0,00
Metacarpo	4,00± 0,00	4,00± 0,00	4,00± 0,00	4,00± 0,00
Metatarso	5,00± 0,00	5,00± 0,00	5,00± 0,00	5,00± 0,00
VértebrasCaudais	3,21± 0,02	3,58± 0,10	3,25± 0,19	3,55± 0,58
VértebrasCervicais	5,00± 0,00	5,00± 0,00	5,00± 0,00	5,00± 0,00
Total	31,21±0,02	31,58±0,10	31,25±0,19	31,55±0,58

Os valores representam média ± d.p.m (n=10/grupo). Não significativo vs grupo controle, ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis.

Foram realizados cortes/microdissecação em 57 fetos do grupo controle, 50 fetos do grupo 100 mg/kg, 50 fetos do grupo 200 mg/kg e 49 fetos do grupo 400 mg/kg para análise visceral. Os resultados mostraram que o tratamento do EAFCi nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg durante o período da organogênese não provoca alterações viscerais quando comparados ao grupo controle.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a administração oral do extrato aquoso de *Chrysobalanus icaco* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, provoca uma discreta toxicidade sistêmica quando administrados durante 28 dias consecutivos, como redução da massa corpórea e consumo de ração, além de alterações hepática e renais. Entretanto, o mesmo extrato não induziu quaisquer alterações quando administrados em dose única de 2.000 mg/kg

Não foram encontradas alterações estatisticamente diferentes na toxicidade materna e desempenho reprodutivo, sugerindo que nas condições experimentais utilizadas nesse estudo o extrato não provoca toxicidade reprodutiva.

Dessa forma, sugere-se a continuação de estudos relacionados à segurança do extrato do *Chrysobalanus icaco*, utilizando outras doses e outras espécies de animais.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, P.A. Implantation and decidualization in rodents. **Journal of Experimental Zoology**. v. 266, p. 603–628, 1993.

AGUIAR, T. M. **Caracterização química e física de folhas, frutos e sementes do bajuru (*Chrysobanalusicaco*, L.) e avaliação do chá dessas folhas em camundongos (*suiss*) normais e diabéticos**. 2010. 171 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

AKAOKA, K.; WHITE, R. H.; RAAFAT, F. Human glomerular growth during childhood: a morphometric study. **J. Pathol.**, v. 173, p. 261-268, 1994.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resolução - RDC Nº 13, de 14 de março de 2013*. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos.

Disponível em: <[http:// bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0013_14_03_2013.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0013_14_03_2013.html)>. Acesso em: 14 de outubro de 2016

ARAÚJO-FILHO, H.G., DIAS, J.D., QUINTANS-JÚNIOR, L.J., SANTOS, M.R., WHITE, P.A., BARRETO, R.S., BARRETO, A.S., ESTEVAM, C.S., ARAUJO, S.S., ALMEIDA, J.R., MENEZES, I.R., COUTINHO, H.D., QUINTANS, J.S. Phytochemical screening and analgesic profile of the lyophilized aqueous extract obtained from *Chrysobalanus icaco* leaves in experimental protocols. **Pharmaceutical Biology**. v. 54, n. 12, p. 3055-3062, 2016

AROUX, M. Behavioral teratogenesis: an extension to the teratogenesis of functions, **Biology Neonate**, v.71, p. 137-147, 1997.

BALBINO, E. E., DIAS, M.F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 6, p. 20, 2010.

BARBOSA, A.P., SILVEIRA, G.D.E.O, DE MENEZES, I.A., REZENDE NETO, J.M., BITENCURT, J.L., ESTAVAM, C.D.O.S.S., DE LIMA, A.D.O. C, THOMAZZI, S.M., GUIMARÃES, A.G., QUINTANS, L.J. JR., DOS SANTOS, M.R. Antidiabetic effect of the *Chrysobalanus icaco* L. aqueous extract in rats. **Journal of Medicinal Food**.v. 16, n. 6, p. 538-43, 2013.

BARIKEL, T.; KELES, O.; BOZKURT, H. H.; KEMAL, A. K. Farelerde *Trifolium pretense* on in Spermatogenesis zerine Etkisine Akut Tok sisitesi. **Turkish Journal of Veterinary & Animal**, Yahşihan, v. 26, p. 555-559, 2002.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Formulário de Fitoterapicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: **Anvisa**, 126p., 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Renome 2013. 8. ed. Brasília, 2013.

BRENT, R.L. What is the relationship between birth defects and pregnancy bleeding? New perspectives provided by the NICHD workshop dealing with the association of chorionic villous sampling and the occurrence of limb reduction defects. **Teratology**, v. 48, p. 93-95, 1993.

BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A; POSSENTI, A.; FOGLIO, M.A; SIQUEIRA, M.G.; CARVALHO, J.E. Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini. **Lecta**, v. 22, n. 1/2, p. 53-58, 2005.

CASTILHO, R.O. et al.A survey of chemical and biological activities of *Chrysobalanaceae*.**Academia Brasileira Ciências**, v. 72, p. 292-293, 2000.

CALLIARI-MARTIN, R. T. Effects of prenatal exposure to restraint stress and monocrotophos on behavioral and physical development in the rat. **Gen. Molecular Biol.** v. 21, n. 3, p. 171, 1998.

CAMPOS, S.C.; SILVA, C.G.; CAMPANA, P.R.V.; ALMEIDA, V.L.1.**Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.373-382, 2016.

CORDEIRO, C.H.G.; CHUNG, M.C.; SACRAMENTO, L.V.S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: Hypericum perforatum e Piper methysticum. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p. 272-278, 2005.

COSTA. J.P.; LOURENÇO, N.V.; SANTOS, C.C.M.P.; TOMÉ, A.R.; SOUSA, G.F.; SOUSA, D.P.; AMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Revista Ciências Farmacêutica Básica Apl**, v. 33, n.3, p. 421-428, 2012.

ENGELMAN, M. F. B.; NETO, J. G.; ANDRADE, C. H. V.; HERNANDEZ, R.; GOULART, L. B. N. T. Estudo morfométrico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológica de tiroxina. Arq. Bras. **Endocrinol. Metab.** v. 45, n. 2, 2001.

ESPINOSA-OSORNIO, G., VARGAS-SIMÓN, G., ENGLEMAN, M. CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA ANATOMÍA FOLIAR DEL ICACO (*Chrysobalanus icaco* L.). **Bioagro**.v.14, n.1, p. 29-32, 2002.

FEITOSA, E.A., XAVIER, H.S., RANDAU, K.P. Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 22, n. 5, 2012.

FERNANDES, C.P.M., FÉLIX, S.R., NOBRE, M.O. Toxicidade dos fitoterápicos de interesse do SUS: uma revisão Toxicity of herbal medicines with interest to SUS: a review, **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 83-96, 2016.

Fernandes, C.P.M.; Félix, S.R, Nobre, M.O. Toxicidade dos fitoterápicos de interesse do SUS: uma revisão. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.37, n.1, p. 83-96, 2016.

FERREIRA-MACHADO, S. C., GAGLIARDI, R. F., NUNES, A. P. M., RODRIGUES, M. P., DANTAS, F. J. S., DE MATTOS, J. C. P., PEREGRINO, C. A. F., MOURA, E. G., CALDEIRA-DE-ARAUJO, A. Antidiabetic and genotoxic effects on Wistar rats treated with aqueous extract from *Chrysobalanus icaco* L. Vol. 8, n. 1, p. 52-57, 2014

FRITZ, H.; GIESE, K. Evaluation of the Teratogenic Potential of Chemicals in the Rat. **Pharmacol**, v. 40, p. 1 - 28, 1990.

GONZALES, J.R. et al. Efectoembriotóxico y teratogênico de *Rutachalepensis* L. «ruda», en ratón (*Mus musculus*). **Revista Peruana Biología**, v.13, n.3, p.223-5, 2006.

GOPINATH, C. Toxicology and pathology of female reproductive tract. **Cell Biol Toxicol**, v.29, p.131-141, 2013.

GRAY, L. E. e col. Use of the Laboratory Rat as a Model in Endocrine Disruptor Screening and Testing. **ILAR Journal**, v. 45, p. 425-437, 2004.

LEMO, A. J. J. M.; SILVA, F. C. A.; MELO, I. M. F.; SILVA-JUNIOR, V. A.; TEIXEIRA, Á. A. C.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Histoquímica e morfometria da placenta de ratas tratadas com dexametasona. **Pesq. Vet. Bras**. v. 34, n. 7, p. 703-708, 2014.

LEMONICA, I.P., 2003. Embriofetotoxicidade. In: Oga S. Fundamentos de Toxicologia, 2 edição, São Paulo: Atheneu 91-99.

MACENA, L.M., NASCIMENTO, A.S.S., KRAMBECK SILVA, F.A., Plantas medicinais utilizadas por gestantes atendidas na unidade de saúde da família (usf) no bairro da Coahb Tuarumã no município de Taguará da Serra, Mato Grosso, **Revista Biologia e Farmácia**, v. 7, p.1, 2012. MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia Clínica. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 536 p. 2008.

PIRES JUNIOR, H. B. Efeitos toxicológicos agudos de extrato de frutos verdes de *Melia azedarach* (MELIACEAE) em ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculus*) e *Artemia salina*. 2010. 70f. **Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal)** - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

NETO, F.C., F.C., PILON, A.L., BOLZANI, V.S., CASTRO-GAMBOA, I. • Chrysobalanaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential. **Phytochemistry Reviews**. v. 12. p. 121-146, 2013.

PAGTALUNAN, M. E.; DRACHMAN, J. A.; MEYER, T. W. Methods for estimating the volume of individual glomeruli. *Kidney Int.* v. 57, p. 2644-2649, 2000.

PRESTA, G.A., FONSECA, A.S., BERNARDO-FILHO, M.A. *Chrysobalanus icaco* extract alters the plasmid topology and the effects of stannous chloride on the DNA of plasmids. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.17, n. 3, p. 331-335, 2007.

PRESTA, G.A.; PEREIRA, N.A. Activity of abejero (*Chrysobalanus icaco* Lin chrysobalanaceae) in experimental study of hypoglycemic plants. **Revista Brasileira de Farmácia**. n. 68, p. 91-101, 1987.

RASWEILER IV, J.J., BADWAIK, N.K. Discoidal Placenta. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **Encyclopedia of Reproduction**, San Diego: Academic Press, v. 1, p. 890-902, 1999.

ROCHA, A.O.B.; SOUSA, L.Q.; MOTA, C.A.X.; SANTOS, E.C.S.; DINIZ, M.F.F. M.; SILVA, M.S.; PIMENTA, M.B.F.; SÁ, R.C.S. Evaluation of the Toxicity of *Pradosia huberi* Extract during the Preimplantation in Wistar Rats. **Bio Med Research International**. p.1-6, 2013

RODRIGUES, H.G.; MEIRELES, C.G.; LIMA, J.T.S.; TOLEDO, G.P.; CARDOSO, J.L.; GOMES, S.L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de

plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas medicinais** [online]. Botucatu, v.13, n.3, p. 359-366, 2011.

.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 161-171, 2008.

SAHOO, N. *et al.* Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia [S.I.]**, v. 81, n. 6, p. 462-471, 2010.

SANDINI, T.M.; BERTO, M.S.; SPINOSA, H.S. Senecio brasiliensis e alcaloides pirrolizidínicos: toxicidade em animais e na saúde humana. **Biotemas**, v. 26, n.2, p.83-92, 2013.

SANTOS, J. S.; VIEIRA, A. B. D.; KAMADA, I. A Rosa Mosqueta no tratamento de feridas abertas: uma revisão. **Revista brasileira de enfermagem**, v.62, n.3, p.457-462, 2009

SANTOS, R.L., GUIMARÃES, G.P., NOBRE, M.S.C., PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no sistema único de saúde. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, v.13, n. 4, p. 486, 2011.

SANTANA, M.L.; REGO, F.A.O; SILVA, A.F. Características de frutos e morfologias de plantas de guajuru (*Chrysobalanus icaco* L.) desenvolvidas no litoral paraibano. **Ceres**.v. 47, n.270, p. 181-187, 2000.

SILVA, E.J.R.; COSTA-SILVA, J.H.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; FRAGA, M.C. C.A.; COELHO, M.C.C; WANDERLEY, A.G. Reproductive assessment of hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis* L. in Wistar rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p.1392-1398, 2009.

SILVA, F. C. A.; TEIXEIRA, A. A .C.; TEIXEIRA, V. W. Efeito da iluminação constante sobre a placenta de ratas: um estudo morfológico, morfométrico e histoquímico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.67, n.3, p.698-706, 2015.

SILVA, I.M.; PEIXOTO, A.L. O abajuru (*Chrysobalanus icaco* L. e *Eugenia rotundifolia* Casar.) comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.1B, p. 325-332, 2009.

SODRÉ, F.L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C.C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratorial**. v.43 n.5, 2007.

SILVEIRA, P.F., BANDEIRA, M.A.M., DOURADO, P.S. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.18, n. 4, p.618-626, 2008.

SÁ, B. M. **ESTUDO DA TOXIDADE NÃO CLÍNICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.** 2014 . 111 f. Dissertação (PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE TROPICAL) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ, MACAPÁ, 2014.

SANDINI, T.M., BERTO, M.S.U., SPINOSA, H.S. Senecio brasiliensis e alcaloides pirrolizidínicos: toxicidade em animais e na saúde humana. **Biotemas**. v.26, n.2, p. 83-92, 2013.

SOARES, T.; DAMASCENO, D.C.; KEMPINAS, W.D.G.; RESENDE, F.M.C.; SANTOS, M.A.C., HIRUMA-LIMA, C.A.; VOLPATO, G.T. Effect of *Himatanthus sucuubain* Maternal Reproductive Outcomeand Fetal Anomaly Frequency in Rats. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 104, n. 5, p. 190-195, 2015.

SULAIMAN, M. O. K.; AHMED, M. W.; SIMISADE, O. T.; IDRIS, O. A.; FARIDAT, I. Z.; TEMITOPE, A. A.; AZIDO, N.; OLUYOMI, S. A. Antimicrobial and toxic potential of aqueous extracts of *Allium sativum*, *Hibiscus sabdariffa* and *Zingiber officinale* in Wistar rats. **Journal of TaibahUniversity for Science**, Holanda, v.8, p.8315-8322, 2014.

TAHRAOUI, A.; ISRAILI, Z.H.; LYOUSSEI, B. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurea erythraea* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.132, p. 48-55, 2010.

TUROLLA DOS REIS, M.S.; DE SOUZA NASCIMENTO, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VALADARES, M.C. Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3, n 2, p. 93-98, 2006.
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf
 acesso em: 15/10/2015

VARGAS, S.G.F, MALDONADO, A.; SOL, Y; MOLINA R.F. Frutales tropicales de Tabasco. Segunda edición, **Centro de Investigación de Ciencias Biológicas**. Unidad Sierra. UJAT. México, p.137, 2000.

VENANCIO, V., CIPRIANO, P., KIM, H., MERCADANTE, A., BIANCHI, M.L., ANTUNES, L., TALCOTT, S., TALCOTT, S. Chrysobalanus icaco L. Anthocyanins Reduced Cell Proliferation and Inflammation in HT-29 Colon Cancer Cells. **The FASEB Journal**, v.9, 2015.

WHITE, P.A.S. **Efeito do extrato aquoso de Abajeru (Crhysobalanus icaco) sobre o peso corporal, adiposidade e sensibilidade à insulina de camundongos obesos**. 2010. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)- Universidade Federal de Sergipe, 2010.

WILSON, J.G.; FRASER, F.C. Handbook of teratology. **New York: Plenum Press**, 1977.

WILSON, J. C. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal. In: WILSON, J.C.; WARKANY. **Teratology: principles and techniques**. Chicago: Univ. of Chicago Press. p. 262-277, 1965.

WHITE, P.A., CERCATO, L.M., BATISTA, V.S., CAMARGO, E.A., DE LUCCA, W. JR., OLIVEIRA, A.S., SILVA, F.T., GOES, T.C., OLIVEIRA, E.R., MORAES, V.R., NOGUEIRA, P.C., DE OLIVEIRA, E., SILVA, A.M., QUINTANS-JUNIOR, L.J., LIMA, B.S., ARAÚJO, A.A., SANTOS, M.R. Aqueous extract of *Chrysobalanus icaco* leaves, in lower doses, prevent fat gain in obese high-fat fed mice. **Journal Ethnopharmacol.** v. 179, p. 92-100, 2016.

WHITE, P.A., ARAÚJO, J.M., CERCATO, L.M., SOUZA, L.A., BARBOSA, A.P., QUINTANS-JUNIOR, L.J., MACHADO, U.F., CAMARGO, E.A., BRITO, L.C., SANTOS, M.R. *Chrysobalanus icaco* L. Leaves Normalizes Insulin Sensitivity and Blood Glucose and Inhibits Weight Gain in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Journal of Medicinal Food.** v. 12, n. 2. P. 155-60, 2015.

WITORSCH, R. J. Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 905 – 912, 2002. Review.

ANEXO A- FOLHA APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50075-920 / Recife - PE - Brasil
Fone: (55 81) 2126 9640 2125 9351
Fax: (55 81) 2125 9350
www.ufpe.br

Recife, 13 de setembro de 2016.

Ofício nº 92/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Teresinha Gonçalves da Silva**
Departamento de Antibióticos
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.016550/2016-38

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Chrysobalanus icaco*", registrada com o nº 23076.016550/2016-38, sob a responsabilidade de Prof.ª Dr.ª Teresinha Gonçalves da Silva - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 30/08/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 11/2016
Espécie/linhagem/raça	Camundongos Swiss e ratos Wistar
Nº de animais	102 camundongos 48 ratos
Peso/idade	25-30g/ 60 dias (camundongos) 200-250g/ 90 dias (ratos)
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Depto de Antibióticos da UFPE

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 2801584