



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-
CLÍNICA DO EXTRATO SECO DE
Schinus terebinthifolius Raddi
(Anacardiaceae)**

Liliane Bezerra de Lima

**RECIFE
2009**

LILIANE BEZERRA DE LIMA

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-
CLÍNICA DO EXTRATO SECO DE
Schinus terebinthifolius Raddi
(Anacardiaceae)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Sette Lopes Lafayette

**RECIFE
2009**

Lima, Liliane Bezerra de

Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato seco de
Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) / Liliane
Bezerra de Lima. – Recife : O Autor, 2009.

vi, 78 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Farmácia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. *Schinus terebinthifolius* - Toxidade. I. Título.

615
615.1

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-032



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 27 de fevereiro de 2009.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 27 de fevereiro de 2009 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
(Deptº de Farmacologia e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
(Deptº Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares
(Deptº de Tecnologia Farmacêutica e de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN)

Assinatura: _____

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Reitor

Amaro Henrique Pessoa Lins

Vice-Reitor

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

José Thadeu Pinheiro

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Márcio Antonio de Andrade Coelho Gueiros

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalci José Brondani

Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antônio Rodolfo de Faria

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Pedro José Rolim Neto

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Beate Saegesser Santos

**Dedico aos meus pais Luci e
Geraldo; à minha irmã Luciana;
ao meu noivo Rafael e aos animais
que perderam a vida para que esta
dissertação fosse concluída.**

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, pelo Sol que ilumina nossos dias, pelas noites que proporcionam repouso e pela saúde que nos mantêm vivos, concedendo-nos diariamente oportunidades de progresso.

Aos meus queridos pais *Geraldo Ferreira de Lima Santos* e *Luci Felipe Bezerra de Lima* pelo amor incondicional, educação proporcionada, incentivo, esforço e confiança que tiveram em mim, bem como por toda dedicação durante os experimentos; os quais foram fundamentais para a construção do meu ser e conclusão desta obra.

A minha querida irmã *Luciana Bezerra de Lima*, que silenciosamente me ensinou a aceitar as diferenças e pela assistência nos momentos mais críticos; e a *Raíssa Figueirêdo de Moraes*, pela oportunidade de amadurecimento espiritual.

Ao meu amado *Jorge Rafael Cavalcanti Ribeiro* por todo amor e carinho dedicados – força motriz que impulsiona o meu viver – pela compreensão, incentivo e enorme amparo durante os experimentos; bem como aos seus pais e familiares, pelo ensino constante de desenvolvimento interior.

Aos meus tios *Gilberto* e *Nilvaneide Bezerra*, *Gercina* e *David Soares* pela orientação desde cedo, estímulo e auxílio nos estudos, assim como a todos meus familiares que de alguma forma contribuíram neste trabalho.

Ao *Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley* pela oportunidade, orientação, presença constante e incentivo à educação continuada e à *Profa. MSc. Maria do Carmo Corrêa de Araújo Fraga* e *Profa. Dra. Simone Sette Lopes Lafayette*, pela orientação na realização deste trabalho, confiança e simpatia transmitida.

Aos companheiros de laboratório: *Bruno de Almeida Andrade*, *Carlos Fernando Brasileiro de Vasconcelos*, *Cristiano Ribeiro de Lima*, *Eduardo da Silva Gonçalves*, *Germana Freire Rocha Caldas*, *Giovanna Christinne Rocha de Medeiros*, *Hélida Maria de Lima Maranhão*, *Iggor Macêdo do Amaral Costa*, *Jamilka Leopoldina da Silva*, *João Henrique da Costa Silva*, *Juciene Bezerra Rodrigues da Silva*, *Julia Celeste Pereira da Silva*, *Larissa Fajardo Ortega*, *Luana Janine Lopes da Costa*, *Mariana Maria de Azevedo Lyra*, *Mirtes Gonçalves Barbosa da Silva*, *Pablo de Ataíde Ferreira*, *Rafaella Farias da Nóbrega*, *Suzianny Dantas da Silva*, *Ticiane Parente Aragão*, *Vanessa Ribeiro Leite* e *Viviane Martins de Arruda*; pela convivência salutar, companheirismo e imenso auxílio neste trabalho – cada um contribuindo ao seu modo e sendo todos muito especiais em minha vida.

A *Rejane de Souza Silva*, *Nielson Melo* e *Zenira Cosme Xavier*, pelo enorme apoio técnico e a *Fredson José Soares (Seu Fredson)*, pelo auxílio geral, bom humor e disposição fora do comum.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, pela oportunidade de convívio e utilização das instalações.

A amiga do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas *Aline Coutinho Cavalcanti* pelo seu caráter e consideração.

Aos colegas de graduação que me impulsionaram a alcançar este grau, em especial à grande amiga e irmã *Rafaella Rodrigues Barreto* e aos seus familiares, por toda bondade, presença constante, apoio e incentivo em todos os meus momentos.

À grande amiga e companheira de Pós-graduação *Leila Denise Elid Soares* e aos seus familiares, que com força de vontade e bom exemplo me deram incentivo para continuar sempre, não importando as provações à frente.

Aos Profs. Drs. *Ana Cristina Lima Leite, Antonio José Alves, Carlucia de Vasconcelos Teixeira, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes e Valdênia Maria Oliveira de Souza* por serem modelos de dedicação, amor à profissão e referência aos estudos, dentro e fora da Universidade.

Ao *Mj. José Almir da Silva* e a todos os integrantes da *Farmácia do Hospital Geral do Recife* pela acolhida fraternal durante minha graduação, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela amizade sincera e pelo exemplo de vida e de profissionalismo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, concedendo bolsas de estudos.

“Os pensamentos são modeladores do ser porque são promotores dos atos. Assim como o homem pensa, naturalmente se comporta.”

Espírito **Manoel Philomeno de Miranda**, psicografado por **Divaldo Pereira Franco**.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DE PLANTAS MEDICINAIS.....	5
2.2. ANÁLISES TOXICOLÓGICAS.....	5
2.2.1. Toxicidade Aguda.....	6
2.2.2. Toxicidade Subcrônica.....	7
2.2.3. Toxicologia do desenvolvimento.....	8
2.2.3.1. Teratologia e Embriofetotoxicidade.....	10
2.2.3.2. Toxicologia da Reprodução.....	11
2.2.3.3. Ratos como Modelo Experimental de Gestação.....	12
2.3. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	13
2.3.1. Botânica.....	13
2.3.2. Etnofarmacologia.....	15
2.3.3. Fitoquímica.....	16
2.3.4. Farmacologia.....	19
2.3.5. Toxicologia.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. GERAL.....	26
3.2. ESPECÍFICOS.....	26
4. ARTIGO I: Acute and subacute toxicity of <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae).....	27
ABSTRACT.....	28

INTRODUCTION.....	29
MATERIALS AND METHODS.....	30
RESULTS.....	33
DISCUSSION.....	34
ACKNOWLEDGEMENTS.....	35
REFERENCES.....	35
5. ARTIGO II: A toxicological evaluation of the effect of <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi on pregnancy in Wistar rats.....	46
ABSTRACT.....	47
INTRODUCTION.....	48
MATERIALS AND METHODS.....	49
RESULTS.....	51
DISCUSSION.....	51
ACKNOWLEDGEMENTS.....	53
REFERENCES.....	53
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1 *Schinus terebinthifolius* Raddi. a. Haste com frutos; b. Haste com flor; c. Ramo com frutificação; d. Nó com duas gemas axilares..... 14

ARTIGO I

- Figura 1 **Figure 1:** Body weight gain curves of female rats treated orally with *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) by oral route for 45 consecutive days. The values are expressed as mean ± S.E.M. (n = 13 animals/group)..... 39
- Figura 2 **Figure 2:** Body weight gain curves of male rats treated orally with *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) by oral route for 45 consecutive days. The values are expressed as mean ± S.E.M. (n = 13 animals/group)..... 39

ARTIGO II

- Figura 1 **Figure 1.** Daily food and water intake of Wistar rats treated with *S. terebinthifolius* dried extract (St, 0.1 to 1.5625 g.kg⁻¹, p.o.) from the 1st to 6th day of pregnancy..... 57
- Figura 2 **Figure 2.** Daily food and water intake of Wistar rats treated with *S. terebinthifolius* dried extract (St, 0.1 to 1.5625 g.kg⁻¹, p.o.) from the 7th to 14th day of pregnancy..... 58

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1	Table 1: Effect of the <i>Schinus terebinthifolius</i> dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg ⁻¹) by oral route on hematological parameters in female Wistar rats treated for 45 consecutive days.....	40
Tabela 2	Table 2: Effect of the <i>Schinus terebinthifolius</i> dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg ⁻¹) by oral route on hematological parameters in male Wistar rats treated for 45 consecutive days.....	41
Tabela 3	Table 3: Effect of the <i>Schinus terebinthifolius</i> dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg ⁻¹) by oral route on biochemical parameters in female Wistar rats treated for 45 consecutive days.....	42
Tabela 4	Table 4: Effect of the <i>Schinus terebinthifolius</i> dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg ⁻¹) by oral route on biochemical parameters in male Wistar rats treated for 45 consecutive days.....	43
Tabela 5	Table 5: Effect of the <i>Schinus terebinthifolius</i> dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg ⁻¹) by oral route on absolute (g) and relative (g.100g ⁻¹ of animal) organ weight in female Wistar rats treated for 45 consecutive days.....	44
Tabela 6	Table 6: Effect of the <i>Schinus terebinthifolius</i> dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg ⁻¹) by oral route on absolute (g) and relative (g.100g ⁻¹ of animal) organ weight in male Wistar rats treated for 45 consecutive days.....	45

ARTIGO II

Tabela 1	Table 1: Effect of oral administration of the <i>Schinus terebinthifolius</i> dried extract (St, 0.1, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg ⁻¹) on reproductive parameters during the pre-implantation period (1 st -6 th day) in pregnant Wistar rats.....	59
Tabela 2	Table 2: Effect of oral administration of the <i>Schinus terebinthifolius</i> dried extract (St, 0.1, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg ⁻¹) on reproductive parameters during the organogenic period (7 th -14 th day) in pregnant Wistar rats.....	60

RESUMO

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) é uma árvore nativa do Brasil, Paraguai e Argentina, sendo cultivada em várias partes do mundo para fins ornamentais, alimentícios e medicinais. Popularmente esta espécie é conhecida no Brasil como aroeira, sendo consagrada, sobretudo pela população nordestina, como planta medicinal de ação cicatrizante e antiinflamatória. Embora seu uso seja amplamente disseminado, existe carência na literatura de informações toxicológicas detalhadas. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a segurança da administração oral do extrato seco da casca do caule de *S. terebinthifolius* (St) em ratos Wistar de ambos os sexos. Para tanto, foram realizados testes de toxicidade aguda nas doses de 0,625 a 5,0 g/kg, de toxicidade subcrônica nas doses de 0,25; 0,625 e 1,5625 g/kg e de toxicidade reprodutiva em ratas prenhes (em período de pré-implantação e de organogênese) nas doses de 0,1; 0,25; 0,625 e 1,5625 g/kg de massa corporal. Os resultados demonstraram que na toxicidade aguda St não produziu mortes ou sinais de toxicidade nos animais em doses de até 5,0 g/kg. A administração por 45 dias de St não alterou os parâmetros bioquímicos e hematológicos, exceto nos grupos de machos tratados, onde houve aumento nos valores do volume corpuscular médio (St 0,25 e 0,625 g/kg; 2,9 e 2,6%, respectivamente) em relação ao grupo controle. Contudo, essas variações se encontraram dentro dos limites fisiológicos descritos para a espécie. Não foram observadas alterações na morfologia macroscópica externa e nas massas absoluta e relativa dos principais órgãos. Na toxicidade reprodutiva, a administração de St durante os períodos de pré-implantação (1º ao 6º dia de prenhez) e de organogênese (7º ao 14º dia de prenhez) não modificou as variáveis reprodutivas analisadas, assim como não demonstrou sinais de toxicidade nas mães e em seus conceptos. Em conclusão, o extrato seco da casca do caule de *Schinus terebinthifolius* é seguro uma vez que apresentou baixa toxicidade aguda e subcrônica por via oral, e não interferiu na capacidade reprodutiva de roedores, no que diz respeito aos processos de implantação do embrião e de organogênese.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius*, toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, toxicidade reprodutiva.

ABSTRACT

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) is a tree native from Brazil, Paraguay and Argentina and is cultivated in several parts of the world for ornamental, medicinal and food purposes. This species is popularly known as Pink Pepper (in USA) and Aroeira (in Brazil) and is widely used, especially in Brazilian Northeast, as a natural medicine for healing and anti-inflammatory action. Although its use is widely spread, there is a lack of toxicological information detailed in the literature. Accordingly, this study was aimed to evaluate the safety of oral administration of dried extract of bark of *S. terebinthifolius* (St) in Wistar rats of both sexes. Thus, tests were carried out acute toxicity at doses from 0.625 to 5.0 g.kg⁻¹, subacute toxicity at doses of 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹ and reproductive toxicity in pregnant rats (pre-implantation and organogenic periods), in doses of 0.1, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹ of body weight. The results showed that the acute toxicity of St did not produce death or signs of toxicity in animals at doses of up to 5.0 g.kg⁻¹. The administration for 45 days of St did not alter the biochemical and hematological parameters, however, in the male groups St (0.25 and 0.625 g.kg⁻¹) induced an increase in the values of the mean corpuscular volume (2.9 and 2.6%, respectively), in relation of the control group. These variations are in the physiological limits described for the specie. No changes were observed in external morphology macroscopic and absolute and relative weights of the principal organs. In reproductive toxicity, the administration of St during the periods of pre-implantation (1st to 6th day of pregnancy) and organogenesis (7th to 14th day of pregnancy) did not provoke alterations on the reproductive variables analyzed, and did not showed any hazardous effect on mothers and its concepts. In conclusion, the dried extract of bark of *Schinus terebinthifolius* is safe because it showed low acute and subacute toxicity by oral route and did not affect the reproductive performance in rodents, with regard to the processes of implantation of the embryo and organogenesis.

Keywords: *Schinus terebinthifolius*, acute toxicity, subacute toxicity, reproductive toxicity.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Compostos que possuem atividades biológicas e são derivados de fontes naturais, como por exemplo, plantas, animais e microorganismos, são definidos como produtos naturais (BAKER et *al.*, 2007). O uso de ervas medicinais tem mantido a sua popularidade por razões históricas e culturais; entretanto, em países em desenvolvimento, 65-80% da população depende exclusivamente das plantas medicinais para os cuidados primários de saúde (AGRA, FREITAS e BARBOSA-FILHO, 2007).

Historicamente, os compostos orgânicos naturais e sintéticos têm sido a força motriz para a descoberta de novos medicamentos. Newman, Cragg, e Snader (2003) realizaram extensa revisão sobre novas drogas introduzidas entre 1981 e 2002, onde 28% das 868 novas substâncias químicas correspondem a produtos naturais ou derivados destes, com outros 24% representando compostos criados a cerca de um grupo farmacofórico de um produto natural.

Atualmente, os produtos naturais ainda desempenham um papel dominante na descoberta de rotas para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças humanas (NEWMAN e CRAGG, 2007) e Butler (2008) demonstra que 13 drogas foram originadas ou derivadas de produtos naturais, de um total de 69 aprovadas para o mercado mundial no período de 2005 a 2007 (22% em 2005, 9% em 2006 e 24% em 2007).

Lam (2007) cita que apesar do sucesso dos produtos naturais como uma fonte de drogas, a maioria das grandes companhias farmacêuticas tem diminuído ou mesmo cessado seu programa de investigação de produtos naturais. Entretanto, o reconhecimento de que a diversidade biológica da Terra está diminuindo rapidamente também está promovendo uma renovação do interesse na investigação em produtos naturais (McCHESNEY, VENKATARAMAN e HENRI, 2007).

Segundo Pupo, Gallo e Vieira (2007), a pesquisa moderna em produtos naturais no Brasil teve início em meados do século passado. O uso na medicina convencional de várias plantas medicinais foi oficializado por inclusão na 1ª Edição da Farmacopéia Brasileira (BRANDÃO et *al.*, 2008). França e colaboradores (2008) enfatizam o atual interesse brasileiro governamental e profissional em associar o avanço tecnológico ao conhecimento popular e ao desenvolvimento sustentável, visando a uma política de

assistência em saúde eficaz, abrangente, humanizada e independente da tecnologia farmacêutica.

Fitoterápico, de acordo com a legislação sanitária brasileira, é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (CARVALHO et al., 2008).

No Brasil, a possibilidade de implementação da fitoterapia no sistema público de saúde do Brasil vem sendo considerada desde 1988 e faz parte das diretrizes da I Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica (BRASIL, 2003). Entretanto, para a utilização de um produto natural com finalidade terapêutica em nível de saúde pública, é fundamental o estabelecimento de sua segurança, eficácia e garantia de qualidade.

Agra, Freitas e Barbosa-Filho (2007) registraram o uso de 483 plantas com potentes propriedades bioativas (dentre elas a espécie *Schinus terebinthifolius*) no Nordeste Brasileiro, sendo muitas delas não estudadas quanto aos seus constituintes químicos e/ou atividades biológicas, embora os seus usos populares tenham sido relatados.

Há ainda uma grande lacuna entre atividades biológicas descritas e uso popular, assim como uma carência de estudos quanto aos efeitos adversos, contra-indicação, toxicidade e validação da eficácia e segurança do fitoterápico nativo (PUPO, GALLO e VIEIRA, 2007). Neste contexto faz-se necessária a avaliação do potencial terapêutico e toxicológico das plantas medicinais, a fim de promover o desenvolvimento de formulações fitoterápicas eficazes e seguras.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso tradicional de diversas plantas medicinais baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Ademais, muitas plantas medicinais possuem substâncias que podem desencadear reações adversas, oriundas pelos seus próprios constituintes ou pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta, extração de seus componentes, até a elaboração do fitoterápico final.

2.2. ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

Toxicologia é o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos, físicos ou biológicos, sobre os organismos vivos e o ecossistema, incluindo a prevenção e melhoria de tais efeitos adversos (SOCIETY OF TOXICOLOGY, 2008).

A obtenção de dados toxicológicos em seres humanos é bastante limitada, sobretudo por motivos éticos, morais e legais. Com isto, as informações toxicológicas sobre os compostos químicos são obtidas basicamente a partir de testes toxicológicos pré-clínicos (BOELSTERLI, 2003), portanto, a Toxicologia continua a depender fortemente do uso de testes em animais para a previsão do potencial de toxicidade em seres humanos (HOUCK e KAVLOCK, 2008).

Conforme a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 251, de 07 de agosto de 1997, a pesquisa pré-clínica deve gerar informações que permitam justificar a realização de pesquisas em seres humanos (BRASIL, 1997), desde que os testes sejam realizados sob condições adequadas e que seja feita a escolha apropriada da espécie e linhagem

animal, via de administração e regime de dosagem (MORTON, 1998). Os resultados pré-clínicos devem permitir demonstrar a relevância dos achados, as possíveis aplicações terapêuticas e antever alguns dos riscos com o seu uso.

De acordo com a Resolução-RE nº 90, de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os métodos que devem ser realizados para os estudos de toxicologia pré-clínica de fitoterápicos são: toxicidade aguda, toxicidade subcrônica (trinta dias a um ano, a depender da frequência de uso do produto), que inclui avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, evolução da massa corporal e histopatologia dos órgãos (BRASIL, 2004). Além dos ensaios de toxicidade aguda e de doses repetidas, a RE nº 90 de 2004 também sugere estudos de genotoxicidade e carcinogenicidade, quando houver indicação de uso prolongado.

2.2.1. Toxicidade aguda

Estudos de toxicidade oral aguda são esperados para servir de base para posteriores ensaios de dose repetida, e fornecer primeiras sugestões para possíveis órgãos-alvo. O período de estudo abrange de 7 a 14 dias, seguido por análises clínicas e patológicas. Tanto a União Européia quanto a legislação Japonesa exigem mais estudos de segurança antes de qualquer aplicação em humanos. Nos Estados Unidos da América, no entanto, a repetição da dose por 14 dias de estudo pode apoiar uma dose única para ensaios clínicos em seres humanos (UKELIS et al., 2008).

O teste de DL₅₀ (dose letal mediana) foi inicialmente introduzido por Trevan (1927) para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como os glicosídeos cardioativos e a insulina. Entretanto, na década de setenta, este teste, o qual tinha como objetivo encontrar uma única dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo teste começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias. Tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana *Food and Drug Administration* (FDA), responsáveis também pela aprovação de novos fármacos. Para a realização do teste da DL₅₀ eram empregados mais de 100 animais para cada espécie estudada (normalmente ratos e camundongos) e para cada substância testada (VALADARES, 2006).

Após muitos anos de controvérsias e debates, o teste da DL₅₀ foi finalmente eliminado no final de 2002 (BOTHAM, 2004) e os testes alternativos empregados hoje, Dose Fixa, Toxicidade Aguda de Classe e Teste “Up and Down”, trouxeram significativa melhora para o bem-estar animal (VALADARES, 2006). O Teste de Dose Fixa tem como princípio identificar a menor dose que causa toxicidade evidente, obtendo a faixa estimada da DL₅₀ e sinais de toxicidade aguda (OECD 420). O Teste Toxicidade Aguda de Classe também utiliza o conceito de doses fixas, porém o objetivo final é a mortalidade (OECD 423); enquanto o Teste “Up and Down” objetiva estimar o valor da DL₅₀ testando sequencialmente animais individuais, com a dose para cada animal sendo ajustada para cima ou para baixo, dependendo do resultado prévio do animal anterior (OECD 425).

Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta (VALADARES, 2006).

Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe; informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico; além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (PURCHASE et al., 1998; BLAAUBOER, 2003; COECKE et al., 2005; PRIETO et al., 2006).

2.2.2. Toxicidade subcrônica

O estudo toxicológico subcrônico avalia a toxicidade de um produto a partir da administração de doses repetidas e diárias. Os testes subcrônicos têm como objetivo determinar os níveis nos quais efeitos tóxicos não são observados e identificar os órgãos mais afetados pela substância química, bem como o grau de comprometimento dos mesmos (FAUSTMAN et al., 1994).

Os parâmetros que devem ser observados diariamente, durante o período de tratamento em testes subcrônicos são: modificações na atividade motora e de comportamento, no consumo de água e ração, no peso dos animais, na cor e na textura dos pêlos e na frequência cardiorrespiratória. Ao final dos experimentos, os animais devem ser sacrificados para coleta de sangue (análise bioquímica e hematológica) e remoção dos órgãos para análise macro e microscópica (BARNES e DOURSON, 1988).

2.2.3. Toxicologia do desenvolvimento

Estima-se que um ser humano possa estar exposto a aproximadamente cinco milhões de diferentes substâncias químicas, porém destas apenas em torno de 1.500 foram testadas em animais e pouco mais de trinta são comprovadamente teratogênicas para o homem. Esse pequeno número se deve às dificuldades de investigação de teratogenicidade nos humanos. Normalmente, os roedores são utilizados nestes estudos, entretanto, devido às diferenças genéticas entre as espécies, alguns estudos não foram bem sucedidos na identificação de teratógenos humanos. Por exemplo, os corticoesteróides, potentes teratógenos em roedores, são considerados seguros para o homem, por outro lado, a talidomida, um teratógeno potente para o homem, é seguro para a maioria dos animais. Desta forma, a evidência definitiva de uma droga ser ou não teratogênica para humanos deve ser procurada no próprio homem (SCHÜLER-FACCINI et al., 2002).

O consumo de medicamentos durante a gravidez é bastante comum. No Reino Unido, cerca de 35% das mulheres consomem medicamentos pelo menos uma vez durante a gravidez, sendo que 6% delas o fazem no primeiro trimestre da gestação (RUBIN, 1995). Na Austrália, 43% das mulheres grávidas consomem medicamentos de venda sob prescrição médica nos dois últimos trimestres da gestação e o percentual aumenta para 95% quando se trata de medicamentos de venda livre (HENRY e CROWTHER, 2000). A realidade brasileira quanto ao padrão de uso de medicamentos na gravidez foi avaliada em 1992 pelo *Collaborative Group on Drug Use in Pregnancy* (CGDUP) dentro de um estudo cooperativo intercontinental, mas são poucos os trabalhos brasileiros sobre esse tema na literatura médica indexada (FONSECA, FONSECA e BERGSTEN-MENDES, 2002).

A toxicologia do desenvolvimento engloba a teratologia e a toxicologia da reprodução. A teratologia estuda as alterações induzidas durante o desenvolvimento, entre a concepção e o nascimento, enquanto que a toxicologia da reprodução se encarrega do estudo dos efeitos adversos que ocorrem nos sistemas reprodutores masculino e feminino resultantes da exposição a agentes químicos (BARROS e DAVINO, 1996).

Os efeitos tóxicos das drogas durante o desenvolvimento podem promover a morte do conceito, malformações congênicas (teratogênese), retardo no desenvolvimento intra-uterino e deficiências funcionais. Além disso, as drogas também podem provocar efeitos deletérios no sistema reprodutor de indivíduos adultos, bloqueando a gametogênese, evitando a ovulação, fertilização ou implantação do embrião (SCHWETZ *et al.*, 1991; BECKMAN, 1997). Os agentes capazes de promover malformações congênicas são chamados teratogênicos, enquanto aqueles que produzem retardo no desenvolvimento, variações na ossificação ou morte do conceito, mas não promovem malformações são conhecidos como embriofetotóxicos (WEBSTER e FREEMAN, 2001).

O impacto e a gravidade desses efeitos estão diretamente relacionados com o período da gestação, a dose ou magnitude da exposição, diferenças entre as espécies, fatores genéticos e toxicocinéticos. Postula-se que 2-4% das malformações sejam espontâneas e que menos de 1% sejam induzidas pelo uso de medicamentos. O percentual aumenta com o uso de drogas ilícitas, sendo o tabaco e o álcool também incluídos (WEBSTER e FREEMAN, 2001).

Os estudos de avaliação dos efeitos das drogas sobre a reprodução avaliam os seguintes parâmetros: fertilidade, transporte e implantação do zigoto, embriogênese, organogênese, função placentária, parto, desenvolvimento pré e pós-desmame até a maturidade sexual (BARROW, 2003).

Do ponto de vista prático, é comum a utilização da classificação adotada pelo FDA de risco do uso de medicamentos. Essa expressa o nível de risco gestacional (A, B, C, D, X) que os fármacos representam para o feto (BRIGGS, FREEMAN e YAFFE, 2005).

Categoria A: Estudos controlados em mulheres não demonstraram risco ao feto no primeiro trimestre (e não há evidência de risco nos demais trimestres), e a possibilidade de prejuízo ao feto parece remota. *Ex: ácido fólico e levotiroxina.*

Categoria B: Os estudos em reprodução animal não demonstraram risco fetal, embora não haja estudos controlados em mulheres grávidas, ou os estudos em reprodução animal demonstraram efeito adverso (não relacionado à diminuição da fertilidade) que não foi confirmado em estudos controlados em mulheres no primeiro trimestre (e não há evidência de risco nos demais trimestres). *Ex: amoxicilina e ceftriaxona.*

Categoria C: Os estudos em animais revelaram efeitos adversos sobre o feto (teratogênico, embriocida ou outro), e não há estudos controlados em mulheres, ou os estudos em mulheres e animais não estão disponíveis. Os fármacos devem ser empregados somente se o benefício potencial justificar o risco potencial ao feto. *Ex: nifedipino e omeprazol.*

Categoria D: Há evidência positiva de risco sobre feto humano, mas os benefícios do uso em mulheres gestantes podem ser aceitáveis a despeito do risco (ex.: se o fármaco é necessário em uma situação de ameaça à vida ou para uma doença grave para a qual fármacos mais seguros não possam ser usados ou sejam ineficazes). *Ex: propiltiouracil.*

Categoria X: Estudos em animais ou humanos demonstraram anormalidades fetais ou há evidência de risco fetal baseado em experiência humana, ou ambos, e o risco de uso do fármaco em mulheres gestantes excede claramente qualquer possível benefício. O fármaco é contra-indicado em gestantes ou mulheres que possam engravidar no decorrer do tratamento. *Ex: misoprostol, varfarina, isotretinoína.*

2.2.3.1. Teratologia e embriofetotoxicidade

De acordo com a sensibilidade aos agentes teratogênicos e embriofetotóxicos, a gestação pode ser dividida em três fases: pré-implantação, organogênese e fetal. A fase de pré-implantação compreende o período que vai desde a fecundação até a implantação do blastocisto no útero (até o 6º dia em ratos e camundongos e até o 17º em humanos) (FRITZ e GIESE, 1990). De acordo com Brent e colaboradores (1993), este estágio inicial da gestação é caracterizado por “tudo ou nada”, ou seja, a exposição materna a agentes químicos pode provocar a embriofetotoxicidade ou não interferir com o

desenvolvimento do embrião. Entretanto, outros autores afirmam que certas injúrias nesse estágio podem resultar em malformações ou retardos no desenvolvimento (GENEROSO et al., 1988; GIAVINI et al., 1990).

A fase de organogênese (7º ao 14º dia de gestação, em ratos e camundongos, e 18º ao 40º dia em humanos) é caracterizada por intensa proliferação e migração celular, remodelamento tissular e formação rudimentar das estruturas do corpo. É o período de maior susceptibilidade à ação de agentes teratogênicos e embriofetotóxicos e no qual o maior número de malformações pode ser induzido (BRENT et al., 1993).

Ao final da organogênese tem início o período fetal, caracterizado por diferenciação e crescimento tissular, maturação fisiológica dos diferentes sistemas e crescimento ponderal do feto (FRITZ e GIESE, 1990). Nesse período, a sensibilidade frente a malformações anatômicas é extremamente baixa, porém a exposição a agentes químicos pode produzir morte celular, inibição da diferenciação e inibição da divisão celular. Essas alterações podem interferir com a formação dos sistemas nervoso, endócrino e imunológico, promovendo desordens funcionais e de comportamento (AUROUX, 1997).

2.2.3.2. Toxicologia da reprodução

Os testes de toxicologia reprodutiva são realizados para determinar os efeitos diretos de uma substância sobre o processo de reprodução de mamíferos. Devido à complexidade dos processos que envolvem a fertilidade e o desenvolvimento, é inevitável que distúrbios fisiológicos originados da exposição a certos agentes possam em muitos casos, exercer um efeito deletério indireto sobre esses processos (LEMÔNICA, 2001).

Os efeitos tóxicos de qualquer substância sobre a fertilidade de machos ou fêmeas ou ambos, geralmente resultam de alterações na função gonadal, no ciclo estral, no comportamento sexual, nas taxas de concepção ou nas fases iniciais da gestação (LOOMIS e HAYES, 1996).

2.2.3.3. Ratos como modelo experimental de gestação

Segundo Gray e colaboradores (2004), a utilização de ratos como modelo animal para triagem reprodutiva é importante, não apenas pela infinidade de informações sobre o controle endócrino da função reprodutiva e desenvolvimento, como também pelas evidências dos efeitos de substâncias tóxicas que alteram o sistema endócrino. Para extrapolar efeitos do rato para o ser humano, é necessário usar as informações disponíveis na literatura para reconhecer as semelhanças e também as diferenças da função endócrina reprodutiva entre mamíferos.

As gestações em ratos e seres humanos exibem certas similaridades que não são compartilhadas por todas as espécies de mamíferos. O intervalo entre o coito e a implantação do blastocisto no útero tem duração similar, de quatro a seis dias, embora a gestação para o primeiro seja de aproximadamente 22 dias, e para os seres humanos seja de aproximadamente 270 dias. Após a implantação, o blastocisto em ratos e seres humanos rompe o epitélio uterino e invade o estroma endometrial, levando à formação da placenta que se caracteriza por uma íntima relação entre as circulações fetal e maternal (hemocorial). A implantação em ratos e seres humanos é também caracterizada por uma pronunciada reação estroma-endométrio, referida como decidualização – a decídua forma o componente maternal da placenta (KNOBIL e NEILL, 1994).

O sucesso da gestação em mamíferos depende da manutenção de níveis adequados de duas classes de hormônios esteróides sexuais, os progestogênios e os estrogênios (WITORSCH, 2002). Apesar destas similaridades nos estágios iniciais da gestação entre ratos e seres humanos, a endocrinologia da gestação destas espécies apresenta diferenças importantes. No rato, o corpo lúteo permanece dominante durante todo o curso da gestação e é a fonte primária de estrogênios e progestogênios (principalmente progesterona). Em seres humanos o corpo lúteo é a fonte primária para produção de esteróides sexuais somente durante o primeiro trimestre de gestação e, após o primeiro trimestre, a placenta é a principal responsável pela secreção de hormônios esteróides em seres humanos, tendo o corpo lúteo papel secundário para a produção destes hormônios (GRAY *et al.*, 2004).

Além das diferenças nas vias de produção de estrogênios entre ratos e humanos, existem diferenças qualitativas e quantitativas destes hormônios secretados. Os corpos lúteos de ratas prenhas sintetizam estradiol e estrona, enquanto em seres humanos a

placenta secreta em adição a esses dois hormônios o estriol. Além disso, os níveis de estrogênios circulantes alcançados durante a gestação, tanto na mãe quanto no feto, são muito maiores em seres humanos do que em ratos (GOLDMAN et al., 2000).

Em seres humanos a diferenciação sexual do trato reprodutivo ocorre relativamente no início da gestação (entre sete e quatorze semanas), e a maioria dos eventos de diferenciação sexual do sistema nervoso central ocorre no período pré-natal. No rato a diferenciação sexual do trato reprodutivo ocorre no final da gestação (após 15 dias) e a diferenciação sexual do sistema nervoso só se completa após o nascimento (GRAY et al., 2004).

2.3. *Schinus terebinthifolius* Raddi

2.3.1. Botânica

Segundo Jones (1997), a espécie *Schinus terebinthifolius* foi descrita pela primeira vez em 1820 por Giuseppe Raddi (1770-1829). De acordo com Joly (2002), o gênero *Schinus* pertence à família *Anacardiaceae*, ordem *Sapindales*, subclasse *Archichlamydeae*, classe *Magnoliopsida*, divisão *Tracheophyta* e reino *Plantae*.

Ferriter (1997) cita que a família *Anacardiaceae* compreende aproximadamente 600 espécies, em 70 gêneros, sendo os gêneros mais conhecidos são: *Rhus*, *Metopium*, *Cotinus*, *Mangifera*, *Pistacia*, *Spondias* e *Schinus*.

Schinus terebinthifolius Raddi (Figura 1) apresenta várias sinonímias botânicas: *S. acutifolia* Engl., *S. glazioviana* Engl., *S. pohliana* Engl., *S. raddiana* Engl., *S. aroeira* Vell., *S. mucronulatus* M. (CORRÊA, 1978), *S. mucronulata* Mart. e *S. antiarthriticus* Mart (FERRITER, 1997).

Schinus terebinthifolius Raddi é uma espécie nativa do Brasil, Paraguai e Argentina (EWEL et al., 1982), que foi introduzida na Flórida como um arbusto ornamental durante a última metade do século XIX (BENNETT e HABECK, 1991) e recentemente é considerada uma planta potencialmente daninha nos Estados Unidos da América (BARBIERI, 2004). No Brasil é encontrada em várias formações vegetacionais, desde o Estado de Pernambuco até o Rio Grande do Sul (FLEIG, 1987; FLEIG e KLEIN, 1989; CARVALHO, 1994).

Popularmente, esta espécie é conhecida no Brasil como “aroeira”, “aroeira-vermelha”, “aroeira-mansa”, “pimenta-do-reino do Brasil”, “cabuí”, “fruto-de-sabiá”; “pink pepper”, “pink berries”, nos Estados Unidos da América; “pfeffer” e “rosa beeren”, na Alemanha; “baies roses de Bourbon” na França, “aguará-mi-ybá”, no Paraguai (PIERIBATTEST et al., 1981; PIRES et al., 2004); “copal” em Cuba; “pimenta do Brasil” em Porto Rico; “nani-o-hilo” no Hawaii; “chichita” na Argentina e também “faux poivrier – falsa pimenta” em Riviera-França (FERRITER, 1997).

A aroeira é uma planta perenifólia, heliófita e pioneira, comum em beiras de rios, córregos e em várzeas úmidas de formações secundárias; entretanto, cresce também em terrenos secos e pobres. Sua altura varia de 5-10 m, dotada de copa arredondada, seu tronco é tortuoso, de 30-60 cm de diâmetro, com casca grossa e fissurada. Apresenta folhas compostas imparipenadas, folíolos subcoriáceos, glabros, em número de 3-10 pares, de 1-5 cm de largura. As suas flores são melíferas, florescendo principalmente durante os meses de setembro a janeiro e frutifica predominantemente no período de janeiro a julho. Suas sementes são amplamente disseminadas por pássaros, o que explica sua boa regeneração natural (LORENZI, 1998).



Figura 1: *Schinus terebinthifolius* Raddi. a. Haste com frutos; b. Haste com flor; c. Ramo com frutificação; d. Nó com duas gemas axilares (TOMLINSON, 1980).

2.3.2. Etnofarmacologia

Aroeira, abreviatura de araroeira (árvore das araras) é um nome tupi dado no Brasil ao aguarayvã; plantas *Anacardiaceae* de três gêneros: *Litsea*, *Schinus* e *Astronium*. Esses aguarayvã (plantas resinosas) eram os principais ingredientes do Bálsamo das Missões (TORRES, 1981). O fato de existir uma grande variedade de espécies conhecidas pelo nome de aroeira tem confundido um pouco sua utilização, no entanto, quase sempre são utilizadas com as mesmas finalidades (SILVA, 1999).

Das cascas das sementes das aroeiras, da pimenta-rosa em especial, extrai-se um óleo muito utilizado na medicina popular e reputado como eficiente no tratamento de febres, tumores, doenças da córnea e das vias respiratórias e urinárias. Aparentemente, todas as partes dessa árvore tropical – folhas, cascas, frutos, sementes, resina e óleo resínico ou bálsamo – foram utilizadas medicinalmente pelas tribos indígenas ao longo dos trópicos (CLEMENTE, 2006).

Nas Américas Central e do Sul, *S. terebinthifolius* é também utilizada como adstringente, antibacteriano, balsâmico, colírio, diurético, medicamento estomacal, tônico e antivirótico. No Peru, a seiva é usada como purgante e diurético, sendo a planta inteira utilizada topicamente para fraturas, além de ser um eficaz anti-séptico. O óleo resinoso é usado como cicatrizante para feridas e dores de dente – uso tópico; e para reumatismo, gota e como purgante – uso interno. Na África do Sul, o chá da folha é usado para tratar resfriados e a decocção das folhas é inalada para resfriados, hipertensão, depressão e arritmia (CLEMENTE, 2006).

A aroeira é consagrada e aceita pela população brasileira por sua ação cicatrizante e antiinflamatória, em especial na região nordestina (BÓRIO, 1973). As folhas produzem uma tintura amarela que é utilizada para cólicas intestinais, hemorragias internas e externas. As cascas são adstringentes, tônicas, diuréticas, úteis contra inflamações, feridas e tumores, tendo sido empregadas também contra *Cholera morbus*. A resina terebinthácea já foi muito preceituada contra reumatismo e ínguas (CORRÊA, 1978).

Devido aos seus efeitos adstringentes, as cascas de *S. terebinthifolius* são utilizadas contra diarreia e hemoptises. Usam-se 100 gramas para 1 litro de água e tomam-se 3 a 4 colheres de sopa ao dia. Aplica-se também contra dor ciática, gota e reumatismo – para tanto, prepara-se um cozimento na proporção de 25 gramas de cascas para 1 litro de água. Toma-se diariamente um banho de 15 minutos, tão quente como se

possa suportar (BALBACH, 1986). Para inflamação com ou sem ferida no colo do útero utiliza-se 30 g de casca para 1 litro de água, ferve-se por 15 minutos e após coar, faz-se lavagem com ducha vaginal (FEITOSA et al., 2004).

Bennet e Habeck (1991) listam a aroeira como uma das melhores plantas na produção de néctar na Flórida e comentam “o mel tem um gosto distintamente apimentado, não sendo considerado de boa qualidade, mas com boa aceitação localmente”.

Segundo Clemente (2006) a pequena semente do fruto de *S. terebinthifolius*, redonda e lustrosa, insere-se entre muitas especiarias existentes utilizadas essencialmente para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária universal. Suas sementes têm um sabor picante, sendo utilizadas em xaropes, vinagres e bebidas no Peru e são acrescentadas a vinhos no Chile. As sementes secas também foram usadas como adulterador da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) em alguns países, além de serem utilizadas como substituto da pimenta dos trópicos.

A utilização dos frutos da pimenta rosa como produto condimentar também pode ser uma alternativa ao uso de outros tipos de pimentas, consideradas prejudiciais ao organismo por apresentarem substâncias como a capsaicina, que de acordo com a quantidade ingerida, pode apresentar toxicidade ou mutagenicidade. Quando comercializados na sua forma desidratada apresentam grande potencialidade de consumo, em virtude de sua elevada aceitabilidade; e grande versatilidade em sua utilização, podendo ser utilizados na gastronomia em produtos variados, salgados e doces, atribuindo-lhes sabor exótico e aromático (BERTOLDI, 2006).

2.3.3. Fitoquímica

A utilização de diferentes partes de *Schinus terebinthifolius* tem sido amplamente documentada na medicina tradicional de vários países. Esta espécie já foi relativamente bem estudada, apresentando extenso número de trabalhos relacionados à identificação e caracterização de seus compostos químicos, bem como estudos relacionados à comprovação de suas atividades terapêuticas.

Análises fitoquímicas conduzidas durante as décadas de 60 e 70 revelaram a presença de diversos compostos químicos, incluindo triterpenos, alcoóis, cetonas, ácidos,

monoterpenos e sesquiterpenos na casca, folhas e frutos da aroeira. Kaistha e Kier (1962) isolaram terebintina e schinol, a partir do extrato em éter dos frutos de *Schinus terebinthifolius*.

Em investigação conduzida com as folhas desta espécie, Campello e Marsaioli (1974) conseguiram isolar alguns triterpenos presentes: ácido masticadienóico, ácido 3 α -hidroximasticadienóico, sitosterol e simiarenol. No ano seguinte, os mesmos autores isolaram bauerenona, α -amirina, α -amirenona e ácido terebintifólico – compostos presentes na casca de *S. terebinthifolius* (CAMPELLO e MARSAIOLI, 1975). Nos frutos da aroeira foram isolados ainda os seguintes componentes terpênicos: ácido masticadienóico, hidroximasticadienóico e ácido ursólico (LLOYD et al., 1977).

Foram identificados no óleo essencial da espécie: α -pineno, β -pineno, sabineno, Δ^3 -careno, α -felandreno, limoneno, β -felandreno, p-cimeno, terpinoleno, cis-sabinol, carvotanacetona, β -cariofileno, α e β -cubebeno, simiarenol, simiarenona, α -amirina e α -amirenona (LLOYD et al., 1977).

As sementes moídas de *Schinus terebinthifolius* são irritantes das mucosas. Stahl (1982) realizou a separação dos compostos fenólicos responsáveis por esta ação, através de cromatografia de camada delgada. No ano seguinte o cardanol – substância irritante cutânea derivada do ácido anacardiáceo – foi isolado e caracterizado dos frutos da espécie, sendo o seu efeito irritante uma combinação com alguns ingredientes do óleo essencial, especialmente α -felandreno e Δ^3 -careno (STAHL, KELLER e BLINN, 1983).

Em pesquisa realizada por Lawrence (1984) foi verificada a presença de 23 compostos no óleo essencial não detectados anteriormente, como por exemplo, os monoterpenos mirceno e cardineno. Em outro estudo químico do óleo essencial dos frutos da aroeira foram identificados os triterpenos: α -pineno, β -pineno, γ -terpineno, limoneno, α -terpinoleno, anetol, timol, carvacrol e β -cariofileno (SANTOS et al., 1986). Hayashi e colaboradores (1989) extraíram e isolaram pentagaloilglicose – um precursor de muitas estruturas complexas de taninos – a partir das partes aéreas da aroeira.

Jain e colaboradores (1995) isolaram e caracterizaram os triterpenos ácido masticadienóico e ácido 3- β masticadienólico (schinol) presentes nos frutos da aroeira. Queires e Rodrigues (1998) demonstraram a variabilidade quantitativa na distribuição de fenóis totais nos diversos órgãos que constituem a parte aérea da aroeira. Os valores médios encontrados, com base no peso úmido (P.U.) foram: fruto = 9,5; flor = 43,8; folha = 40,3; caule córtex = 32,1 e caule lenho = 18,1 mg/g P.U.

Na análise obtida a partir do extrato metanólico das cascas do caule da *Schinus terebinthifolius* Raddi, foi encontrada uma predominância de compostos polifenólicos e terpenóides. Dentre os polifenóis, confirma-se a existência de forte concentração de taninos catéquicos, sendo atribuída a estes, boa parte da bioatividade dessa planta (ARAÚJO, 2002).

Dois novos ésteres bifênil (4' – etil – 4 – metil – 2, 3', 5', 6 – tetrahidroxi [1, 1' – bifênil] – 4, 4' – dicarboxilato e 3 – etil – 3' – metil – 4, 4', 5, 5', 6, 6' – hexahidroxi – [1, 1' – bifênil] 3, 3' – dicarboxilato) e três biflavonóides (agastisflavona, robustaflavona, tetrahidrorobustaflavona) foram isolados e caracterizados a partir do extrato aquoso-metanólico dos frutos de *Schinus terebinthifolius* (KASSEM, EL-DESOKY e SHARAF, 2004). Os frutos da aroeira-vermelha apresentam baixo teor de compostos fenólicos, possuindo o extrato alcoólico uma quantidade significativa da flavona apigenina, além do tanino ácido elágico (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ e PRADO, 2005).

Em análise fitoquímica realizada por Lima e colaboradores (2006) no extrato etanólico obtido da entrecasca da espécie, foram identificados fenóis, triterpenos pentacíclicos e antraquinonas; em extração com hexano utilizando a mesma parte da planta, os testes foram positivos para a presença de flavonas, flavonóides, xantonas, esteróides livres. Estudo fitoquímico da fase em acetato de etila oriunda do extrato em etanol das folhas de *S. terebinthifolius* conduziu ao isolamento de cinco compostos fenólicos: galato de etila, miricetrina, quercitrina, galato de metila e miricetina; supostamente responsáveis pela potente atividade antioxidante desta espécie (CERUKS et al., 2007).

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelou que o ácido gálico, metil galato e 1,2,3,4,6-pentagaloilglicose são os principais componentes aromáticos da fração acetato de etila das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi (CAVALHER-MACHADO et al., 2008).

2.3.4. Farmacologia

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas extraídos de plantas incluem: terpenóides e óleos essenciais, alcalóides, lectinas e polipeptídios, e substâncias fenólicas e polifenóis, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides, taninos e cumarinas (GONÇALVES, ALVES-FILHO e MENEZES, 2005).

O extrato etanólico a 50% obtido das folhas da aroeira apresentou significativa atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, nas concentrações de 12,6 e 63 mg/mL em método de difusão em ágar (MARTINEZ et al., 1996); e também nas concentrações de 50 e 100% frente a bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (MARTINEZ, ALONSO-GONZÁLEZ e BADELL, 1996). Em trabalho realizado por Guerra e colaboradores (2000), o extrato a 80% das mesmas partes do vegetal foi testado pelo mesmo método frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Os resultados obtidos neste estudo mostram que mesmo em menor concentração (1%) a inibição do crescimento dos microrganismos foi evidente, e a resposta foi progressivamente aumentada com concentração de até 80%.

O extrato seco etanólico das partes aéreas da aroeira da praia (700 mg de extrato em 7 g de gel inerte com 15 mg de glicerol) foi aplicado topicamente em alvéolos dentais de ratos Wistar após indução de alveolite por adrenalina e também testado *in vitro* em microorganismos promotores de alveolite (*Enterococcus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus* não pertencentes ao grupo A, B e D, *Bacillus corineforme* Gram-positivo, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* e *Escherichia coli*. O extrato apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* semelhante à da gentamicina contra os microrganismos testados, bem como boa reparação da alveolite e melhor cicatrização (MELO-JÚNIOR et al., 2002).

Em análise realizada por Schmourlo e colaboradores (2005) utilizando um extrato aquoso (200 mg/ 30mL) obtido a partir das partes aéreas do vegetal em métodos de difusão em ágar e diluição em caldo, foi avaliada a atividade antifúngica contra: *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* e *Cryptococcus neoformans*, onde se demonstrou que a aroeira-vermelha apresenta atividade significativa apenas contra

Candida albicans (zonas claras de inibição com índice de retenção (R_f) de 0.80). O extrato etanólico a 80% das folhas da aroeira apresentou potencial atividade antifúngica também contra *Candida glabrata* (concentração inibitória mínima (CIM) = 125 µg/mL) e *Sporothrix schenckii* (CIM = 15 µg/mL), em teste de microdiluição em caldo com concentrações de 1000 a 7,8µg/mL de aroeira (JOHANN et al., 2007).

Degáspari, Waszczynskyj e Prado (2005) analisaram a atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos dos extratos aquoso e alcoólico obtidos de frutos de *Schinus terebinthifolius* frente à *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*, em concentração de 10^8 células/mL, utilizando o método de difusão em disco de papel com 20 µL de solução a 100 mg/mL dos extratos em estudo. Constatou-se neste estudo que apenas o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório às cepas de *Staphylococcus aureus* (halo de inibição de 9 mm) e *Bacillus cereus* (halo de inibição de 11 mm), mas sem efeito inibitório para as outras cepas testadas.

O extrato etanólico em concentração de 10 mg/mL da entrecasca desta espécie demonstrou excelente atividade antibacteriana, particularmente frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a fluoroquinolonas e a macrolídeos, em método de difusão em ágar, demonstrando valores de CIM menores ou iguais a 100 mg/mL. (LIMA et al., 2006). As frações em acetato de etila obtidas a partir das folhas de *S. terebinthifolius* demonstraram efeito anti-adesivo sobre cepas de *Candida albicans* em células epiteliais bucais, mesmo em menor concentração (15 µg/mL) e também não apresentaram citotoxicidade em macrófagos murinos (JOHANN et al., 2008).

As partes aéreas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) demonstraram significativa atividade inibitória (79,8% com 50 µg/mL) contra xantina oxidase de leite de vaca, devido à presença de pentagaloilglicose – inibidor desta enzima. Um inibidor de xantina oxidase pode ser utilizado potencialmente como agente terapêutico para hiperuricemia que causa gota, cálculos renais ou isquemia miocárdica (HAYASHI et al., 1989).

A atividade antioxidante do extrato metanólico das partes aéreas da aroeira foi bem descrita em concentrações de 1 a 100 µg/mL, removendo radicais livres superóxido e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), protegendo contra a peroxidação lipídica enzimática e não enzimática, em membranas microssomais hepáticas de ratos (VELÁZQUEZ et al., 2003).

Os efeitos antiproliferativos dos polifenóis purificados a partir das folhas da aroeira foram investigados por citometria de fluxo em linhagem celular de carcinoma prostático humano, e resultaram em ativação lisossomal e aparecimento de vacúolos autofágicos, induzindo a morte celular. No entanto, a natureza destes polifenóis permanece desconhecida (QUEIRES et al., 2006).

Jain e colaboradores (1995) demonstraram que os triterpenos ácido masticadienólico e ácido 3- β -masticadienólico (schinol) presentes nos frutos da aroeira apresentam atividade antiinflamatória, por serem inibidores competitivos específicos da enzima fosfolipase A₂ presente em pâncreas de porco, fluido sinovial humano e em veneno de abelha. Estes componentes isolados do extrato em acetato de etila dos frutos de *S. terebinthifolius* apresentaram mais de 80% de inibição da atividade catalítica da fosfolipase A₂.

Com o propósito de estabelecer o efeito analgésico e antiinflamatório do extrato hidroalcoólico a 30% de folhas de *Schinus terebinthifolius* por via oral, Mourelle e colaboradores (1997) administraram diferentes doses em ratos de ambos os sexos em modelos de placa quente, contorções por ácido acético, granuloma induzido por algodão, pleurisia por carragenina e hipertrofia do timo provocada por adrenalectomia. Comprovou-se que o extrato nas doses de 500, 200 e 125 mL/kg apresenta atividade frente aos modelos de contorções e de fase crônica da inflamação – granuloma induzido por algodão; porém, não houve atividade analgésica do extrato no modelo de placa quente e nem na fase aguda da inflamação – pleurisia por carragenina e nem preveniu a hipertrofia do timo, o que sugere mecanismo analgésico e antiinflamatório do tipo não-esteroidal.

A emulsão preparada a partir do extrato hidroalcoólico obtido da entrecasca da espécie demonstrou significativa atividade cicatrizante e antiinflamatória, frente os modelos de ferida aberta em dorso de rato (dose de 1,5 g/kg) e o teste de edema de pata induzido por carragenina (dose de 2,5 g/kg), respectivamente (SILVA, 1999). Amorim e Santos (2003) em estudo clínico randomizado, duplo-cego e controlado com quarenta e oito mulheres apresentando vaginose bacteriana sintomática constataram que o gel vaginal produzido com casca de aroeira demonstrou-se eficaz no tratamento da vaginose bacteriana, promovendo 84% de cura nas pacientes tratadas.

O extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Schinus terebinthifolius* aplicado em dose única intraperitoneal de 100 mg/kg mostrou efeito positivo no processo de cicatrização de anastomoses de cólon em ratos, evidenciado através de análise

macroscópica e histológica (COUTINHO et al., 2006) e na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexigas de ratos Wistar, diminuindo a fase aguda do processo inflamatório e, conseqüentemente, acelerando os eventos típicos de fase regenerativa (LUCENA et al., 2006). Entretanto o mesmo extrato, em mesma dose e via de administração não alterou o processo de cicatrização do estômago quanto à avaliação macroscópica, tensiométrica e microscópica, em ratos que tiveram o estômago lesado com rafia de fio polipropileno (SANTOS et al., 2006), bem como não influenciou no processo de cicatrização em nível macroscópico, em estudo de cicatrização de parede abdominal de ratos após laparotomias medianas; porém em análise histológica, a aroeira proporcionou efeito cicatrizante (NUNES-JÚNIOR et al., 2006).

Em feridas de dorso de ratos tratadas por via tópica com extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Schinus terebinthifolius* na concentração de 100 mg/mL, houve aumento na área média e retardo na reepitelização das feridas da pele (CASTELO-BRANCO NETO et al., 2006). A aplicação tópica do extrato das folhas de *S. terebinthifolius* atuou acelerando o processo de reparo epitelial, estimulando a queratinização; bem como atuou no reparo do tecido conjuntivo, diminuindo a intensidade do processo inflamatório crônico e a angiogênese e acelerando a maturação do colágeno em lesões ulceradas induzidas por hidróxido de sódio a 40% na mucosa bucal de ratos (RIBAS et al., 2006).

O pré-tratamento oral com a fração acetato de etila das folhas de *S. terebinthifolius* (100 mg/kg) e também com os compostos isolados desta (metil galato e 1,2,3,4,6 – pentagalatoilglicose, 10 mg/mL) inibiram significativamente o edema de pata induzido pelo composto 48/80 e, em menor extensão, o edema de pata induzido por ovoalbumina. Nas doses de 100 e 200 mg/kg, a fração também inibiu o edema induzido pela histamina, impedindo a degranulação de mastócitos. Em modelo de pleurisia, o pré-tratamento oral com a fração (100 mg/kg) inibiu significativamente o acúmulo total de leucócitos e eosinófilos nas cavidades pleurais 24 h após injeção intratorácica de ovoalbumina em camundongos (CAVALHER-MACHADO et al., 2008).

Dados obtidos no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-clínica de Produtos Bioativos da Universidade Federal de Pernambuco mostraram que o extrato seco do caule de *Schinus terebinthifolius* por via oral nas doses de 50 a 300 mg/kg protegeu a lesão gástrica induzida por etanol e indometacina em ratos Wistar (DADOS NÃO PUBLICADOS).

2.3.5. Toxicologia

Existem relatos clínicos antigos a respeito de manifestações tóxicas produzidas pela aroeira. Peckolt (1889) já relatava sobre irritação e prurido da pele ao entrar em contato com folhas de *Schinus terebinthifolius*.

Campello e Marsaioli (1974) relataram que os frutos, quando ingeridos, apresentam um “efeito paralisante” sobre os pássaros. Os efeitos tóxicos e narcóticos sobre os pássaros e em animais selvagens têm sido relatados em outros trabalhos, como cita Workman (1979), demonstrando a “ação hipnótica” do extrato dos frutos da aroeira (o qual apresenta os triterpenos terebintona e schinol) em galinhas e camundongos. Lampe e McCann (1985) mencionam que os tripterpenos encontrados nos frutos podem provocar irritação na garganta, gastroenterite, diarreia e vômitos em humanos.

Em seres humanos, a alta concentração de monoterpenos voláteis (e aromáticos) tem sido sugerida como a causa mais provável de problemas respiratórios associados aos frutos moídos de *S. terebinthifolius*. O fato de que doenças respiratórias disseminadas têm ocorrido quando a árvore está em floração sugere que estes compostos voláteis podem ser também produzidos pelas flores (LLOYD et al., 1977). Acredita-se que o cheiro proveniente das inflorescências (que ocorrem por quase todo o ano) da pimenta rosa causa congestão nasal, irritação dos olhos, dor de cabeça, espirros e dificuldades de respiração nas pessoas (MORTON, 1978).

Em muitos lugares se acredita que o óleo essencial contido nesta planta tenha propriedades venenosas, mas o que ocorre de fato é uma reação alérgica dos indivíduos mais sensíveis, sem causar maiores danos. Também por esses motivos a pimenta brasileira é conhecida como falsa-pimenta ou aroeira-mansa (CLEMENTE, 2006).

Em relação à avaliação toxicológica, poucas informações são descritas na literatura. Em trabalho realizado por Ruiz e colaboradores (1996) foi verificada a ausência de efeitos genotóxicos no extrato hidroalcoólico das folhas da aroeira. Uma análise preliminar de toxicidade aguda (DL₅₀) do extrato bruto dos frutos da aroeira em camundongos revelou valor estimado de DL₅₀ superior a 5000 mg/kg, em administração por via oral, enquanto que pela via intraperitoneal o valor obtido foi de 3500 mg/kg (PIRES et al., 2004). Em estudo realizado por Araújo (2002) avaliando a toxicidade aguda do extrato metanólico bruto obtido das cascas da aroeira em ratos, não foi revelado qualquer sinal de toxicidade ou morte relacionada ao tratamento.

Apesar de *Schinus terebinthifolius* ter seu uso amplamente disseminado para diversos fins, são escassos os dados existentes na literatura quanto à sua segurança. Testes toxicológicos pré-clínicos e clínicos são de fundamental importância para a avaliação da segurança de qualquer medicamento, principalmente os de origem vegetal, que são rotineiramente tidos pela população como substâncias seguras e isentas de efeitos colaterais.

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3. 1. Geral

Avaliar a toxicidade pré-clínica do extrato seco da casca do caule de *Schinus terebinthifolius* Raddi em ratos Wistar.

3. 2. Específicos

- ✓ Estimar o valor de DL₅₀ por via oral do extrato seco de *Schinus terebinthifolius* em ratos Wistar;
- ✓ Analisar o efeito da administração oral do extrato seco de *Schinus terebinthifolius* durante a prenhez (fases de pré-implantação e organogênese) em ratas Wistar e em seus conceitos;
- ✓ Investigar o efeito da administração oral subcrônica do extrato seco de *S. terebinthifolius* sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar machos e fêmeas;
- ✓ Averiguar o efeito do tratamento subcrônico com o extrato seco de *S. terebinthifolius* por via oral sobre a massa, morfologia macroscópica externa e microscopia dos órgãos e tecidos de ratos Wistar de ambos os sexos.

4. Artigo I

Artigo submetido ao Journal of Ethnopharmacology

Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae).

L. B. Lima^a, C. F. B. Vasconcelos^a, H. M. L. Maranhão^a, V. R. Leite^a, P. A. Ferreira^b, B. A. Andrade^a, S. S. L. Lafayette^{a,b}, A. G. Wanderley^{a,b,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, 50740-521, Brazil.

^b Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, 50760-901, Brazil.

*Corresponding author. Almir Gonçalves Wanderley, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CEP: 50670-901- Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil – Tel: 55-81-2126-8350, fax: 55-11-2126-8976. Email address: almirgw@globo.com

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) has been used in traditional Brazilian medicine especially to treat inflammatory and haemostatic diseases. *Aim of the study:* The objective of this study was to evaluate the acute and subacute toxicity (45 days) of *S. terebinthifolius* by the oral route in Wistar rats of both sexes. *Materials and Methods:* For the acute toxicity test, the dried extract of *S. terebinthifolius* bark was administered in doses from 0.625 to 5.0 g.kg⁻¹ (n = 5/group/sex) and in the subacute toxicity test were used the following doses: 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹.day⁻¹ (n = 13/group/sex), for 45 consecutive days. *Results:* In the acute toxicity test, *S. terebinthifolius* did not produce any toxic signs or deaths. The subacute treatment with *S. terebinthifolius* did not alter the body weight gain and the food and water consumption. The hematological and biochemical analysis did not show significant differences in any of the parameters examined in female or male groups, except in two male groups, in which the treatment with *S. terebinthifolius* (0.25 and 0.625 g.kg⁻¹) induced an increase of MCV values (2.9 and 2.6%, respectively). These variations are in the physiological limits described for the specie and does not have clinical relevance. *Conclusion:* The acute and subacute administration of the dried extract of *Schinus terebinthifolius* bark did not produced toxic effects in Wistar rats.

Keywords: *Schinus terebinthifolius* Raddi; Anacardiaceae; acute toxicity; subacute toxicity.

1. Introduction

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) is a native plant from South America occurring in the Brazilian states from Bahia to Rio Grande do Sul (Corrêa, 1974). Popularly is called Pink Pepper or Pink Berries in USA and Aroeira or Cabuí, in Brazil (Pires et al., 2004).

In folk medicine has been used as remedies for ulcers, respiratory problems, wounds, rheumatism, gout, tumors, diarrhea, skin ailments, arthritis (Morton, 1978) and as antiseptic, antiinflammatory, balsamic and haemostatic (Medeiros et al., 2007). As a haemostatic, it is used 100g of bark per L of water and it is drunk about 30-40mL per day and for rheumatism 25 g.L⁻¹ and take a hot bath for 15 minutes (Balbach, 1986). The importance of this plant promoted its inclusion in Brazilian Pharmacopeia (Brandão et al., 2006).

Well studied by the chemical point of view the presence of several constituents, as terpens (Campello and Marsaioli, 1975; Lloyd et al., 1977), phenols (Stahl et al., 1983; Ceruks et al., 2007), pentagalloylglucose – precursor of many complex structures of tannins (Hayashi et al., 1989) and flavonoids (Kassem et al., 2004; Degáspari et al., 2005) has already been proved in this specie. Furthermore, the chemical analysis of the bark of *Schinus terebinthifolius* proved the existence of anthraquinones, xanthones and free steroids (Lima et al., 2006).

The hydroalcoholic extract of the leaves of “Aroeira” showed significant antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, addicted to an antifungal action against *Candida albicans*, in concentrations of 12.6 and 6.3 mg.mL⁻¹ (Martinez et al., 1996; Martinez et al., 2000). The ethanolic extract of *S. terebinthifolius* bark (1 mg.mL⁻¹), demonstrated excellent activity against resistant strains of *Staphylococcus aureus*, with minimum inhibitory concentration (MIC) values $\leq$ 100 mg.mL⁻¹ (Lima et al., 2006).

The aqueous extract of the leaves of *S. terebinthifolius* showed antiinflammatory activity of non-steroidal type, in the granuloma model caused by cotton in the back of mice, by oral treatment with doses from 0.125 to 0.5 g.kg⁻¹ (Mourelle et al., 1997). In the pleurisy model, the oral pre-treatment with 0.1 g.kg⁻¹ of the acetate fraction of Pink Pepper leaves inhibited significantly the accumulation of the total leukocytes and eosinophils in mice (Cavalher-Machado et al., 2008).

The hydroalcoholic extract of *S. terebinthifolius* bark by intraperitoneal route (i.p.) in dose of 0.1 g.kg⁻¹ had a positive effect on the healing process of anastomoses of the colon (Coutinho et al., 2006), in healing of surgical wounds in bladders (Lucena et al., 2006) and, by topic route, in wounds of the back (Castelo-Branco Neto et al., 2006) in rats.

Although its use is widely spread, there is a lack of detailed toxicological information in the literature. Therefore, the aim of the present study was to assess the toxicity of the dried extract of the bark of *Schinus terebinthifolius* Raddi in Wistar rats.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and extraction

The bark of the stem of *Schinus terebinthifolius* was supply by AKSY Company (São Paulo, Brazil). A voucher specimen authenticated in the Department of Botany of the UFPE, was deposited in the Geraldo Mariz Herbarium under record number 8758. The extraction was performed by maceration air dried and 5 kg of pulverized *S. terebinthifolius* bark with 10 L of ethanol 70% (v/v) at room temperature, for 7 days and was occasionally shaken. In our laboratory, the crude ethanolic extract was evaporated to dryness under reduced pressure for total elimination of alcohol, followed by lyophilization, yielding approximately 348 g of dry residue. The lyophilized extract of *Schinus terebinthifolius* (St) was kept at room temperature until its use and suspended in distilled water.

2.1. Animals

Adult female and male Wistar rats (*Rattus norvegicus* var. *albinus*), (aged 2 and 3 months, weighing 210-230g and 250-320g, respectively) were obtained from the Department of Physiology and Pharmacology at the Federal University of Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Brazil. The animals were maintained in standard environmental conditions (22-24°C; 12:12 h dark/light cycle). Water and industrialized dry food (Labina[®], Purina, Brazil) were available *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Biological Science Center of UFPE (Process n° 23076.011331/2008-52), in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.3. Acute toxicity

Healthy albino rats of either sex fasted overnight, but allowed access to water *ad libitum* were randomly divided into five groups ($n = 5/\text{sex}$). The first group (control group) received distilled water orally. Groups 2-4 were orally treated with *Schinus terebinthifolius* at the doses of 0.625, 1.25, 2.5 or 5.0 g.kg^{-1} of body weight, respectively. Animals were observed for general behavioral and body weight changes, hazardous symptoms and mortality for a period of 14 days after treatment. The lethal dose (LD_{50}) was estimated according to the method described by Miller and Tainter (1944).

2.4. Subacute toxicity

The method was performed according to the OECD Test Guidelines with slightly modifications (OECD, 1995). Male and female healthy rats were randomly divided into four groups by sex ($n = 13/\text{group}$). Animals received water vehicle orally (control group) or *Schinus terebinthifolius* at the doses of 0.25, 0.625 or 1.5625 $\text{g.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ for 45 consecutive days. The body weight was recorded weekly and its consumption of food and water intake monitored daily. Animals were observed for signs of abnormalities during the treatment period. At the end of the treatment, animals were fasted overnight, but allowed access to water *ad libitum*. Then anesthetized with Nembutal[®] (0.035 g.kg^{-1} , i.p.), and the blood samples were obtained by retro-orbital puncture (Waynforth, 1980), using capillary tubes for hematological and biochemical studies, with and without anticoagulant EDTA, respectively.

2.5. Hematological and biochemical analysis

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyzer (Coulter STKS, Beckman). The parameters included: red blood cell (RBC) count, white blood cell (WBC) count, hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), Red Cell Distribution Width (RDW), platelets count and mean platelet volume (MPV). The differential leukocyte counting was performed with an optical microscopy after staining and, in each case, 100 cells were counted. For biochemical analysis, blood was centrifuged at 1 500 g for 10 min to obtain serum, which was stored at -20°C until determination of the following parameters: glucose; blood urea nitrogen (BUN); creatinine; aspartate aminotransferase

(AST); alanine aminotransferase (ALT); total cholesterol; triglycerides; high-density lipoproteins (HDL); amylase; gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and total, direct and indirect bilirubin. The dosages were made using Architect (Abott®) automation with Boehringer Ingelheim® biochemical kits.

2.6. Morphological study

After euthanasia of animals by an excess of Nembutal® (0.140 g.kg⁻¹, i.p.), necropsy was proceeded (n = 5/group/sex) for analysis of the macroscopic external of heart, liver, spleen, lungs, kidney, adrenal gland, esophagus, stomach, small intestine (fragment of 6-7 cm), hypophysis, hypothalamus, brain and reproductive organs (uterus and ovary or testicle, prostate, epididymis, seminal vesicle and vas deferens). These organs were carefully removed and weighed individually. Organ weights were expressed in terms absolute and relative (g and g.100g⁻¹ of body weight, respectively). Histological examination was performed in five animals per group/sex. Animals were anesthetized with Nembutal® (0.035 g.kg⁻¹, i.p.), perfused with saline solution (for removal of blood) followed by buffered formalin solution (10%) for 10 minutes and the same organs were removed and fixed in Bouin solution for 48 h at room temperature. Tissue slices were processed according to the method described by Lison (1960) and stained with hematoxylin/eosin.

2.7. Statistical analysis

The results are expressed as mean value $\pm$ standard error of mean (SEM). Variance in data for body weights, food and water consumption, hematology, serum biochemistry and organ weights (both absolute and relative weights) was checked for homogeneity by Bartlett's procedure. If the variance was homogeneous, the data were assessed by one-way analysis of variance followed by Tukey test. If not, the Kruskal-Wallis test was applied and when statistically significant differences were indicated, the Dunn test was employed for comparison between the control and treatment groups. A probability level of less than 5% ($p < 0.05$) was considered significant. Statistical analyses were performed with the aid of the software GraphPad Prism 5®.

3. Results

3.1. Acute toxicity

The results indicated that *Schinus terebinthifolius* acute treatment by oral route at doses up to 5.0 g.kg⁻¹ did not produce any sign of toxicity or death in rats during 14 days of observation. Therefore, the LD₅₀ could not be estimated, and it is possible more than 5.0 g.kg⁻¹.

3.2. Subacute toxicity

No toxicity signs (as piloerection, alteration in the locomotor activity or diarrhea) or deaths were recorded during the 45 consecutive days of treatment by oral route with *Schinus terebinthifolius* at doses of 0.25, 0.625 or 1.5625 g.kg⁻¹. No significant differences were found between the initial and final body weight of the rats treated with *Schinus terebinthifolius* and control rats (Figures 1 and 2). A similar absence of toxic effect was observed in the case of food and water consumption (data not show).

3.3. Hematological and biochemical parameters

The hematological profile of the treated and control groups are presented in Tables 1 and 2. For the females rats, there were not any differences statistically significant in all parameters examined. However, in the male groups, *Schinus terebinthifolius* (0.25 and 0.625 g.kg⁻¹ groups) induced an increase in the values of mean corpuscular volume (2.9 and 2.6%, respectively) in relation of the control group.

The biochemical profile of the treated and control groups are presented in Tables 3 and 4. There were not differences statistically significant in all biochemical parameters analyzed.

3.4. Morphological parameters

The absolute and relative tissue weights were not altered by *Schinus terebinthifolius* treatment (Tables 5 and 6). The macroscopic analysis of the target organs of the treated animals did not show significant changes in color and texture when compared with the control group. In addition, the microscopical analysis did not suggest histological alterations in all organs examined (data not show).

4. Discussion

This study tested the acute and subacute toxicity of the dried extract of *Schinus terebinthifolius*, which is popularly used as a natural medicine in Brazil. *Schinus terebinthifolius* was orally administered at doses from 0.625 to 5.0 g.kg⁻¹ in acute toxicity test and during 45 days (subacute toxicity test), at daily doses of 0.25, 0.625 or 1.5625 g.kg⁻¹ of body mass.

The results of the acute toxicity study indicated that *S. terebinthifolius* by oral route with the doses until 5.0 g.kg⁻¹ did not produce any sign of toxicity or death in rats, suggesting a LD₅₀ above 5.0 g.kg⁻¹ by oral route. According to Kennedy et al. (1986), substances that present LD₅₀ higher than 5.0 g.kg⁻¹ by oral route can be considered practically non-toxic. Therefore, it can be suggested that acute toxicity of the *Schinus terebinthifolius* is practically null by oral route. Similar results with fruits of *Schinus terebinthifolius* were observed by Pires et al. (2004) in mice.

Likewise, the subacute treatment showed that of *S. terebinthifolius* at doses of 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹.day⁻¹ during 45 consecutives days did not produce any deaths or clinical signs of toxicity. In addition, the body weight, water and food intake were not altered during the treatment period. The doses used in the present study represent up to 5.2 and 15.6 times more than the used as a haemostatic (Balbach, 1986) and as an analgesic and antiinflammatory agent (Cavalher-Machado et al., 2008), respectively.

With the exception of an increase in the MCV, whose levels are in the physiological limits described for the specie (Harkness and Wagner, 1993), there were not any significant alterations in the hematological parameters. Analysis of blood parameters is relevant to risk evaluation as the changes in the hematological system have a higher predictive value for human toxicity, when the data are translated from animal studies (Olson et al., 2000).

A similar absence of toxic effects was observed in the biochemical parameters. Whereas, there was not effect on the levels of aminotransferases (ALT and AST) and gamma-glutamyl transpeptidase, and creatinine, which are good indicators of liver and kidney functions, respectively, it is reasonable to deduce that the *S. terebinthifolius* dried extract did not induced any damage to the liver and the kidneys. This is further confirmed by the histological assessment of these organs and the fact that there was no

effect on plasma cholesterol levels, the latter being an indirect indicator of liver function (Hilaly et al., 2004).

Since the oral dose of $1.5625 \text{ g.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ of *S. terebinthifolius* administered for 45 consecutive days did not induce any biochemical, hematological, anatomical and histopathological sign of toxicity, it can be defined as the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for Wistar rats of both sexes under the experimental conditions used. However, it should be emphasized that this NOAEL was derived from a subacute study only. For a more reliable safety evaluation performed on the basis of the acceptable daily intake concept, data on the chronic toxicity, reproductive toxicity, genotoxicity and carcinogenicity of *Schinus terebinthifolius* are also required.

Taken together, the data suggest that oral administration of *Schinus terebinthifolius* dried extract did not induce toxic effects, which could be assured the medicinal use of this plant in folk medicine.

Acknowledgements

The authors thank Rejane de Souza Silva for excellent technical assistance and CAPES and CNPq for financial support. We also thank Simone Marques for proofreading the manuscript.

References

- Balbach, A., 1986. As Plantas Curam 1 Ed., EDEL, São Paulo, Brazil, 108-109 p.
- Brandão, M. G. L.; Cosenza, G. P.; Moreira, R. A.; Monte-Mor, R. L. M., 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. Brazilian Journal of Pharmacognosy 16, 408-420.
- Campello, J. P.; Marsaioli, A. J., 1975. Terebenthifolic acid and baurenone, new triterpenoid ketones from *Schinus terebinthifolius*. Phytochemistry 14, 2300-2302.
- Castelo-Branco Neto, M. L.; Ribas Filho, J. M.; Malafaia, O.; Oliveira Filho, M. A.; Czezko, N. G.; Aoki, S.; Cunha, R.; Fonseca, V. R.; Teixeira, H. M.; Aguiar, L. R. F., 2006. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. Acta Cirúrgica Brasileira 21, 17-22.

- Cavalher-Machado, S. C.; Rosas, E. C.; Brito, F. A.; Heringe, A. P.; Oliveira, R. R.; Kaplan, M. A. C.; Figueiredo, M. R.; Henriques, M. G. M. O., 2008. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology* 8, 1552-1560.
- Ceruks, M.; Romoff, P.; Fávero, O. A., Lago, J. H. G., 2007. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova* 30, 597-599.
- Corrêa, M. P., 1974. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, v. 3, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brazil, 125-126 p.
- Coutinho, I. H. I. L. S.; Torres, O. J. M.; Matias, J. E. F.; Coelho, J. C. U.; Stahlke Júnior, H. J.; Agulham, M. A.; Bachle, E.; Camargo, P. A. M.; Pimentel, S. K.; Freitas, A. C. T., 2006. Efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira* 21, 49-54.
- Degáspari, C. H.; Waszczynskyj, N.; Prado, M. R. M., 2005. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia Lavras* 29, 617-622.
- Harkness, S. E.; Wagner, J. E., 1993. *Biologia e clínica de coelhos roedores*. Livraria Roca, São Paulo, Brasil, pp. 48-55.
- Hayashi, T.; Nagayama, K.; Arisawa, M.; Shimizu, M.; Suzuki, S.; Yoshizaki, M.; Morita, N., 1989. Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a paraguayian crude drug, "molle-I" (*Schinus terebinthifolius*). *Journal of Natural Products* 52, 210-211.
- Hilaly, J. E.; Israili, Z. H.; Lyoussi, B., 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 43-50.
- Kassem, M. E. S.; El-Desoky, S. K.; Sharaf, M., 2004. Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebenthifolus*. *Chemistry of Natural Compounds* 40, 447-450.
- Kennedy, G. L.; Ferenz, R. L.; Burgess, B. A., 1986. Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD₅₀. *Journal of Applied Toxicology* 6, 145-148.
- Lima, M. R. F.; Luna, J. S.; Santos, A. F.; Andrade, M. C. C.; Sant'ana, A. E. G.; Genet, J. P.; Márquez, B.; Neuville, L.; Moreau, N., 2006. Anti-bacterial of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 137-147.

- Lison, L., 1960. *Histochimie et Cytochimie Animales*. Gauthiers-Villars, Paris, pp. 842.
- Lloyd, H. A.; Jaouni, T. M.; Evans, S. L.; Morton, J. F., 1977. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 16, 1301-1302.
- Lucena, P. L. H.; Ribas Filho, J. M.; Mazza, M.; Czeckzo, N. G.; Dietz, U. A.; Correa Neto, M. A.; Henriques, G. S.; Santos, O. J.; Ceschin, A. P.; Thiele, E. S., 2006. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira* 21, 44-49.
- Martinez, M. J.; Betancourt, J.; Alonso-González, N.; Jauregui, A., 1996. Screening of Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 52, 171-174.
- Martinez, M. J.; Barreiro, M. L.; Rodriguez, Z. M.; Rubalcaba, Y., 2000. Actividad antimicrobiana de um extrato fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 5, 23-25.
- Medeiros, K. C. P.; Monteiro, J. C.; Diniz, M. F. F. M.; Medeiros, I. A.; Silva, B. A.; Piuvezam, M. R., 2007. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17, 23-28.
- Miller, L. C.; Tainter, M. L., 1944. Estimation of the LD₅₀ and its error by means of logarithmic probity graph paper. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 57, 261.
- Morton, J. F., 1978. Brazilian pepper - Its impact on people, animals and the environment. *Economic Botany* 32, 353-359.
- Mourelle, J. A. F.; Domínguez, L. E. S.; Rodríguez, F. J. M.; Rodríguez, Z. M.; Gutiérrez, Z. P., 1997. Actividad analgésica y antiinflamatoria de un extracto hidroalcohólico de *Schinus terebinthifolius*. *La Habana*, 42 p.
- Olson, H.; Betton, G.; Robinson, D.; Thomas, K.; Monro, A.; Kolaja, G.; Lilly, P.; Sanders, J.; Sipes, G.; Bracken, W.; Dorato, M.; Deun, K.V.; Smith, P.; Berger, B.; Heller, A.; 2000. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32, 56-67.
- Organisation Economic for Cooperation and Development (OECD), 1995. Guidelines for testing of chemicals, Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents # 407, Paris.

- Pires, O. C.; Taquemasa, A. V. C.; Akisue, G.; Oliveira, F.; Araújo, C. E. P., 2004. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL₅₀) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L.). Latin American Journal of Pharmacy 23, 176-82.
- Stahl, E.; Keller, K.; Blinn, C., 1983. Cardanol, a skin irritant in pink pepper. Planta Medica 48, 5-9.
- Waynforth, B. H., 1980. Injection techniques - Experimental and Surgical Techniques in the Rat. Academic Press, London, p.3-61.

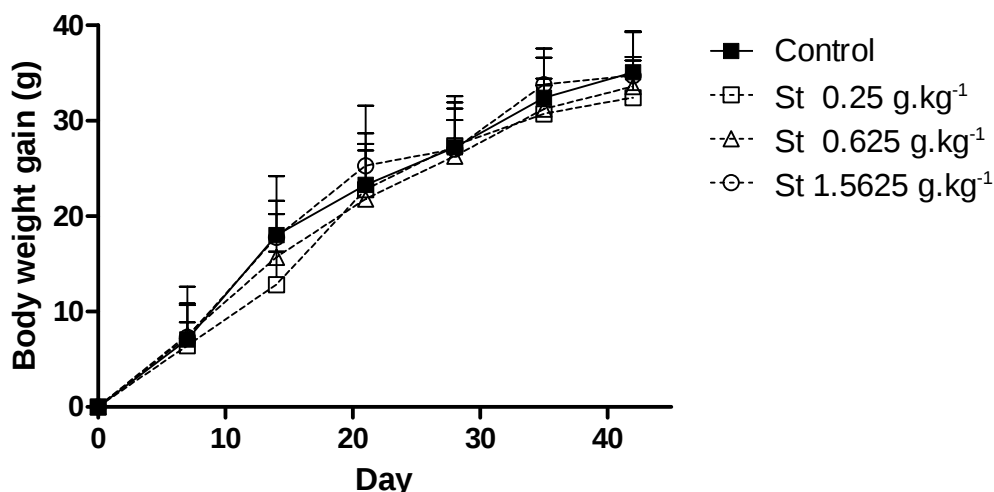


Figure 1: Body weight gain curves of female rats treated orally with *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) by oral route for 45 consecutive days. The values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n = 13 animals/group).

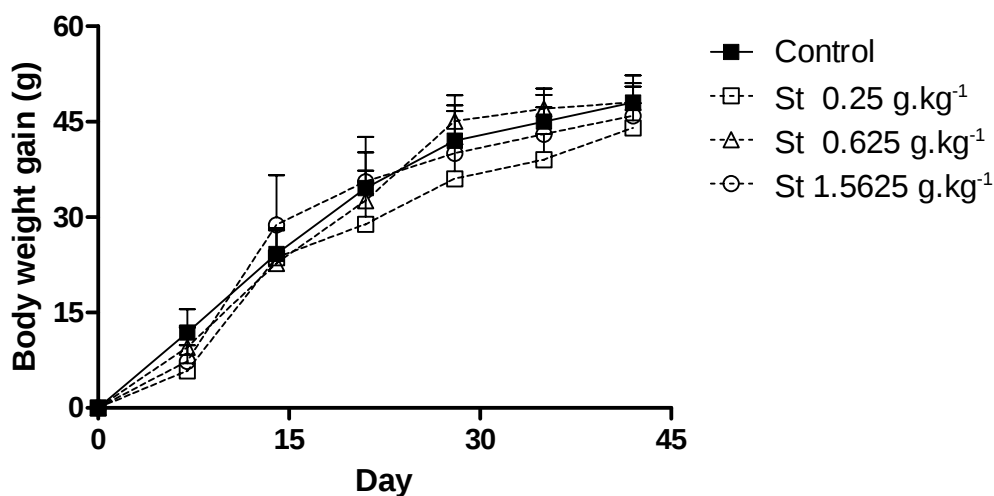


Figure 2: Body weight gain curves of male rats treated orally with *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) by oral route for 45 consecutive days. The values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n = 13 animals/group).

Table 1: Effect of the *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) by oral route on hematological parameters in female Wistar rats treated for 45 consecutive days

PARAMETER	CONTROL	St 0.25 g.kg ⁻¹	St 0.625 g.kg ⁻¹	St 1.5625 g.kg ⁻¹
Erythrocytes (10⁶/μL) ^b	7.29 ± 0.37	7.69 ± 0.10	7.70 ± 0.08	7.76 ± 0.10
Hemoglobin (g/dL) ^b	15.82 ± 0.18	15.37 ± 0.27	15.63 ± 0.11	15.52 ± 0.17
Hematocrit (%) ^b	41.71 ± 2.05	43.92 ± 0.52	43.93 ± 0.39	43.74 ± 0.50
MCV (fL) ^a	57.18 ± 0.23	57.06 ± 0.38	57.01 ± 0.28	56.37 ± 0.32
MCH (pg) ^b	22.68 ± 1.77	20.00 ± 0.30	20.28 ± 0.12	20.00 ± 0.12
MCHC(g/dL) ^b	39.59 ± 2.99	35.02 ± 0.45	35.56 ± 0.12	35.45 ± 0.09
RDW (%) ^a	12.13 ± 0.15	12.17 ± 0.19	12.16 ± 0.10	12.65 ± 0.21
Platelets (10³/μL) ^a	847.54 ± 36.98	826.31 ± 55.23	965.08 ± 28.80	942.08 ± 32.44
WBC (10³/μL) ^a	10.09 ± 0.60	9.69 ± 0.72	9.88 ± 0.50	8.61 ± 0.44
MPV (fL) ^b	6.08 ± 0.18	5.90 ± 0.08	5.79 ± 0.06	5.78 ± 0.08
Neutrophils (%) ^a	7.48 ± 1.38	12.22 ± 1.97	10.02 ± 1.59	11.65 ± 1.44
Lymphocytes (%) ^a	88.45 ± 1.97	83.20 ± 2.98	87.86 ± 1.82	86.07 ± 1.49
Monocytes (%) ^b	1.34 ± 0.61	0.71 ± 0.26	0.06 ± 0.02	0.72 ± 0.60
Eosinophils (%) ^a	1.38 ± 0.19	1.16 ± 0.12	1.51 ± 0.27	1.02 ± 0.17
Basophils (%) ^b	1.34 ± 0.60	2.71 ± 2.08	0.56 ± 0.12	0.54 ± 0.18

Values represent the mean ± SEM (n = 13/group). MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width; WBC, white blood cell; MPV, mean platelet volume.

No statistically different from control group (^a ANOVA or ^b Kruskal-Wallis Test, *p* > 0.05).

Table 2: Effect of the *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) by oral route on hematological parameters in male Wistar rats treated for 45 consecutive days

PARAMETER	CONTROL	St 0.25 g.kg ⁻¹	St 0.625 g.kg ⁻¹	St 1.5625 g.kg ⁻¹
Erythrocytes (10 ⁶ /μL) ^b	8.35 ± 0.21	7.43 ± 0.06	7.32 ± 0.08	7.56 ± 0.14
Hemoglobin (g/dL) ^b	15.72 ± 0.34	14.72 ± 0.14	14.48 ± 0.16	14.59 ± 0.23
Hematocrit (%) ^b	44.55 ± 1.01	40.82 ± 0.36	40.15 ± 0.49	40.49 ± 0.63
MCV (fL) ^a	53.35 ± 0.39	54.91 ± 0.26*	54.76 ± 0.28*	53.55 ± 0.22
MCH (pg) ^b	18.85 ± 0.18	19.81 ± 0.08	19.78 ± 0.16	19.31 ± 0.09
MCHC(g/dL) ^b	35.30 ± 0.25	36.04 ± 0.13	36.07 ± 0.17	36.01 ± 0.07
RDW (%) ^b	15.04 ± 0.36	18.10 ± 1.33	16.55 ± 0.36	18.57 ± 0.77
Platelets (10 ³ /μL) ^b	949.54 ± 27.73	1081.85 ± 19.58	1069.09 ± 25.29	1066.15 ± 48.31
WBC (10 ³ /μL) ^a	11.20 ± 0.76	12.90 ± 0.70	11.59 ± 0.64	11.55 ± 0.54
MPV (fL) ^a	5.48 ± 0.07	5.21 ± 0.06	5.29 ± 0.10	5.29 ± 0.05
Neutrophils (%) ^a	18.12 ± 3.62	16.45 ± 2.47	21.92 ± 3.40	20.45 ± 2.48
Lymphocytes (%) ^a	76.99 ± 3.40	80.66 ± 2.58	75.99 ± 3.51	77.45 ± 2.42
Monocytes (%) ^b	0.18 ± 0.08	0.85 ± 0.26	0.38 ± 0.18	0.36 ± 0.16
Eosinophils (%) ^b	1.74 ± 0.51	1.57 ± 0.32	1.31 ± 0.25	1.34 ± 0.21
Basophils (%) ^b	2.97 ± 1.82	0.46 ± 0.21	0.40 ± 0.11	0.40 ± 0.13

Values represent the mean ± SEM (n = 13/group). MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width; WBC, white blood cell; MPV, mean platelet volume.

* Statistically different from control group (^a ANOVA followed by Tukey, *p* < 0.05).

No statistically different from control group (^a ANOVA or ^b Kruskal-Wallis Test, *p* > 0.05).

Table 3: Effect of the *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) by oral route on biochemical parameters in female Wistar rats treated for 45 consecutive days

PARAMETER	CONTROL	St 0.25 g.kg ⁻¹	St 0.625 g.kg ⁻¹	St 1.5625 g.kg ⁻¹
Glucose (mg/dL)	81.30 ± 7.73	63.51 ± 5.35	74.10 ± 6.19	58.88 ± 7.34
BUN (mg/dL)	44.80 ± 2.00	46.48 ± 2.33	46.28 ± 1.87	43.15 ± 1.61
Creatinine (mg/dL)	0.56 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.55 ± 0.01
AST (U/L)	139.15 ± 11.77	169.08 ± 11.15	146.42 ± 11.92	147.46 ± 12.78
ALT (U/L)	71.46 ± 3.12	73.85 ± 4.19	62.25 ± 3.26	64.38 ± 1.85
Total cholesterol (mg/dL)	96.50 ± 4.84	88.82 ± 6.70	100.14 ± 3.66	98.12 ± 5.50
Triglycerides (mg/dL)	64.85 ± 6.65	64.23 ± 5.78	74.31 ± 6.10	73.41 ± 7.53
HDL (mg/dL)	65.95 ± 2.77	61.38 ± 3.25	66.48 ± 2.24	65.38 ± 3.30
Amylase (U/L)	615.62 ± 41.65	484.69 ± 47.79	582.50 ± 38.69	498.46 ± 21.63
GGT (U/L)	2.50 ± 0.01	2.52 ± 0.02	2.48 ± 0.02	2.53 ± 0.01
Total bilirubin (mg/dL)	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01
Direct bilirubin (mg/dL)	0.06 ± 0.003	0.06 ± 0.004	0.05 ± 0.004	0.05 ± 0.003
Indirect bilirubin (mg/dL)	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.00

Values represent the mean ± SEM (n = 13/group). BUN, blood urea nitrogen; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HDL, high-density lipoproteins; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase.

No statistically different from control group (ANOVA, $p > 0.05$).

Table 4: Effect of the *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) by oral route on biochemical parameters in male Wistar rats treated for 45 consecutive days

PARAMETER	CONTROL	St 0.25 g.kg ⁻¹	St 0.625 g.kg ⁻¹	St 1.5625 g.kg ⁻¹
Glucose (mg/dL) ^a	87.62 ± 3.29	99.02 ± 4.14	102.38 ± 4.21	98.62 ± 4.52
BUN (mg/dL) ^a	41.42 ± 1.36	46.62 ± 1.37	46.67 ± 1.27	43.25 ± 2.08
Creatinine (mg/dL) ^a	0.56 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.56 ± 0.01
AST (U/L) ^b	143.54 ± 12.48	144.62 ± 31.92	115.83 ± 9.45	114.85 ± 3.67
ALT (U/L) ^b	80.77 ± 2.54	79.00 ± 6.47	65.58 ± 2.08	72.54 ± 3.26
Total cholesterol (mg/dL) ^a	77.77 ± 2.20	67.58 ± 3.28	73.05 ± 3.24	74.12 ± 3.15
Triglycerides (mg/dL) ^b	84.52 ± 3.67	82.45 ± 6.90	73.41 ± 8.14	82.10 ± 8.31
HDL (mg/dL) ^a	43.10 ± 1.56	38.53 ± 1.11	41.03 ± 1.88	41.30 ± 1.68
Amylase (U/L) ^a	902.46 ± 59.21	782.46 ± 29.07	814.67 ± 35.41	864.23 ± 56.11
GGT (U/L) ^b	2.54 ± 0.01	2.52 ± 0.02	2.51 ± 0.01	2.50 ± 0.01
Total bilirubin (mg/dL) ^a	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Direct bilirubin (mg/dL) ^a	0.05 ± 0.006	0.05 ± 0.004	0.04 ± 0.003	0.05 ± 0.005
Indirect bilirubin (mg/dL) ^a	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.01

Values represent the mean ± SEM (n = 13/group). BUN, blood urea nitrogen; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HDL, high-density lipoproteins; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase.

No statistically different from control group (^a ANOVA or ^b Kruskal-Wallis Test, *p* > 0.05).

Table 5: Effect of the *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) by oral route on absolute (g) and relative (g.100g⁻¹ of animal) organ weight in female Wistar rats treated for 45 consecutive days

PARAMETER	CONTROL	St 0.25 g.kg ⁻¹	St 0.625 g.kg ⁻¹	St 1.5625 g.kg ⁻¹
Spleen (g) ^a	0.468 ± 0.048	0.415 ± 0.021	0.433 ± 0.027	0.478 ± 0.047
(g.100g ⁻¹) ^a	0.204 ± 0.016	0.179 ± 0.007	0.187 ± 0.012	0.209 ± 0.022
Brain (g) ^a	1.134 ± 0.048	1.094 ± 0.040	1.124 ± 0.047	1.076 ± 0.026
(g.100g ⁻¹) ^a	0.500 ± 0.029	0.471 ± 0.007	0.484 ± 0.014	0.469 ± 0.017
Heart (g) ^b	0.853 ± 0.058	0.747 ± 0.027	0.825 ± 0.023	0.810 ± 0.009
(g.100g ⁻¹) ^b	0.376 ± 0.030	0.322 ± 0.005	0.356 ± 0.011	0.353 ± 0.008
Esophagus (g) ^a	0.089 ± 0.003	0.084 ± 0.001	0.089 ± 0.003	0.089 ± 0.003
(g.100g ⁻¹) ^a	0.039 ± 0.002	0.036 ± 0.001	0.038 ± 0.002	0.039 ± 0.002
Stomach (g) ^a	1.319 ± 0.037	1.304 ± 0.036	1.239 ± 0.049	1.279 ± 0.031
(g.100g ⁻¹) ^b	0.594 ± 0.018	0.474 ± 0.079	0.534 ± 0.019	0.558 ± 0.021
Liver (g) ^a	8.220 ± 0.178	8.222 ± 0.140	8.356 ± 0.246	8.239 ± 0.358
(g.100g ⁻¹) ^a	3.610 ± 0.077	3.555 ± 0.122	3.605 ± 0.101	3.599 ± 0.221
Adrenal gland (g) ^a	0.0229 ± 0.0022	0.0252 ± 0.0016	0.0263 ± 0.0026	0.0293 ± 0.0018
(g.100g ⁻¹) ^a	0.0100 ± 0.0008	0.0109 ± 0.0007	0.0113 ± 0.0010	0.0128 ± 0.0010
Hypophysis (g) ^a	0.0043 ± 0.0002	0.0041 ± 0.0001	0.0040 ± 0.0001	0.0042 ± 0.0001
(g.100g ⁻¹) ^a	0.0019 ± 0.0001	0.0018 ± 0.0001	0.0017 ± 0.0001	0.0018 ± 0.0001
Hypothalamus (g) ^a	0.0271 ± 0.0006	0.0282 ± 0.0009	0.0254 ± 0.0013	0.0274 ± 0.0006
(g.100g ⁻¹) ^a	0.0119 ± 0.0003	0.0122 ± 0.0006	0.0110 ± 0.0006	0.0119 ± 0.0003
Small intestine (g) ^a	0.506 ± 0.023	0.525 ± 0.019	0.501 ± 0.009	0.505 ± 0.012
(g.100g ⁻¹) ^a	0.222 ± 0.009	0.226 ± 0.008	0.216 ± 0.006	0.220 ± 0.009
Ovary (g) ^a	0.043 ± 0.003	0.041 ± 0.003	0.042 ± 0.002	0.041 ± 0.002
(g.100g ⁻¹) ^a	0.019 ± 0.002	0.018 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.018 ± 0.001
Lungs (g) ^a	1.091 ± 0.034	1.065 ± 0.052	1.159 ± 0.020	1.148 ± 0.061
(g.100g ⁻¹) ^a	0.479 ± 0.017	0.458 ± 0.014	0.501 ± 0.014	0.499 ± 0.023
Kidney (g) ^a	0.829 ± 0.034	0.767 ± 0.044	0.874 ± 0.095	0.846 ± 0.027
(g.100g ⁻¹) ^a	0.365 ± 0.019	0.330 ± 0.013	0.376 ± 0.037	0.369 ± 0.015
Uterus (g) ^a	0.546 ± 0.086	0.466 ± 0.069	0.407 ± 0.038	0.514 ± 0.049
(g.100g ⁻¹) ^a	0.242 ± 0.042	0.199 ± 0.026	0.175 ± 0.015	0.225 ± 0.025

Values represent the mean ± SEM (n = 5/group).

No statistically different from control group (^a ANOVA or ^b Kruskal-Wallis Test, *p* > 0.05).

Table 6: Effect of the *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) by oral route on absolute (g) and relative (g.100g⁻¹ of animal) organ weight in male Wistar rats treated for 45 consecutive days

PARAMETER	CONTROL	St 0.25 g.kg ⁻¹	St 0.625 g.kg ⁻¹	St 1.5625 g.kg ⁻¹
Spleen (g)	0.622 ± 0.056	0.601 ± 0.032	0.630 ± 0.031	0.563 ± 0.032
(g.100g ⁻¹)	0.166 ± 0.009	0.178 ± 0.006	0.178 ± 0.008	0.147 ± 0.014
Brain (g)	1.251 ± 0.024	1.260 ± 0.017	1.262 ± 0.015	1.223 ± 0.005
(g.100g ⁻¹)	0.337 ± 0.015	0.376 ± 0.017	0.358 ± 0.012	0.318 ± 0.023
Heart (g)	1.150 ± 0.052	1.107 ± 0.039	1.131 ± 0.053	1.091 ± 0.053
(g.100g ⁻¹)	0.308 ± 0.009	0.330 ± 0.016	0.319 ± 0.013	0.282 ± 0.018
Vas deferens (g)	0.125 ± 0.006	0.129 ± 0.011	0.141 ± 0.017	0.131 ± 0.006
(g.100g ⁻¹)	0.034 ± 0.002	0.038 ± 0.004	0.039 ± 0.004	0.034 ± 0.001
Epididymis (g)	0.615 ± 0.046	0.600 ± 0.035	0.640 ± 0.018	0.626 ± 0.020
(g.100g ⁻¹)	0.165 ± 0.012	0.177 ± 0.006	0.181 ± 0.008	0.162 ± 0.011
Esophagus (g)	0.148 ± 0.009	0.141 ± 0.010	0.135 ± 0.009	0.161 ± 0.007
(g.100g ⁻¹)	0.040 ± 0.004	0.042 ± 0.004	0.038 ± 0.003	0.042 ± 0.004
Stomach (g)	1.514 ± 0.040	1.647 ± 0.047	1.614 ± 0.062	1.623 ± 0.052
(g.100g ⁻¹)	0.408 ± 0.018	0.491 ± 0.023	0.456 ± 0.013	0.421 ± 0.028
Liver (g)	11.079 ± 0.135	11.058 ± 0.083	11.095 ± 0.148	11.114 ± 0.230
(g.100g ⁻¹)	2.987 ± 0.131	3.302 ± 0.165	3.141 ± 0.077	2.898 ± 0.242
Adrenal gland (g)	0.0239 ± 0.0016	0.0254 ± 0.0021	0.0209 ± 0.0034	0.0213 ± 0.0027
(g.100g ⁻¹)	0.0065 ± 0.0005	0.0075 ± 0.0003	0.0059 ± 0.0009	0.0054 ± 0.0006
Hypophysis (g)	0.0041 ± 0.0001	0.0042 ± 0.0001	0.0044 ± 0.0001	0.0042 ± 0.0001
(g.100g ⁻¹)	0.0011 ± 0.0001	0.0012 ± 0.0000	0.0013 ± 0.0000	0.0011 ± 0.0001
Hypothalamus (g)	0.0355 ± 0.0011	0.0347 ± 0.0014	0.0349 ± 0.0010	0.0343 ± 0.0007
(g.100g ⁻¹)	0.0096 ± 0.0006	0.0104 ± 0.0008	0.0100 ± 0.0003	0.0089 ± 0.0007
Small intestine (g)	0.597 ± 0.078	0.586 ± 0.087	0.562 ± 0.073	0.678 ± 0.045
(g.100g ⁻¹)	0.162 ± 0.025	0.171 ± 0.021	0.160 ± 0.023	0.177 ± 0.018
Prostate (g)	0.673 ± 0.096	0.645 ± 0.035	0.570 ± 0.044	0.556 ± 0.045
(g.100g ⁻¹)	0.177 ± 0.017	0.191 ± 0.010	0.163 ± 0.016	0.142 ± 0.009
Lungs (g)	1.615 ± 0.096	1.601 ± 0.129	1.673 ± 0.095	1.470 ± 0.048
(g.100g ⁻¹)	0.436 ± 0.035	0.476 ± 0.036	0.472 ± 0.020	0.384 ± 0.038
Kidney (g)	1.250 ± 0.043	1.167 ± 0.059	1.242 ± 0.062	1.216 ± 0.059
(g.100g ⁻¹)	0.336 ± 0.013	0.346 ± 0.013	0.351 ± 0.014	0.313 ± 0.015
Testicle (g)	1.688 ± 0.076	1.627 ± 0.063	1.614 ± 0.048	1.657 ± 0.053
(g.100g ⁻¹)	0.455 ± 0.029	0.483 ± 0.017	0.456 ± 0.011	0.430 ± 0.030
Seminal vesicle (g)	0.470 ± 0.011	0.469 ± 0.008	0.487 ± 0.020	0.466 ± 0.009
(g.100g ⁻¹)	0.127 ± 0.007	0.140 ± 0.005	0.138 ± 0.007	0.122 ± 0.011

Values represent the mean ± SEM (n = 5/group).

No statistically different from control group (ANOVA, $p > 0.05$).

5. Artigo II

Artigo a ser submetido ao Journal of Ethnopharmacology

A toxicological evaluation of the effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi on pregnancy in Wistar rats.

**Liliane B. Lima^a, Cristiano R. Lima^a, Germana F. R. Caldas^a, Igor M. A. Costa^b,
Giovanna C. R. Medeiros^b, Jamilka L. Silva^b, Rafaella F. Nóbrega^b, Simone S. L.
Lafayette^{a,b}, Almir G. Wanderley^{a,b}***

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, 50740-521, Brazil.

^b Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, 50760-901, Brazil.

*Corresponding author. Almir Gonçalves Wanderley, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CEP: 50670-901- Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil - Email address: almirgw@globo.com

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) has been used in Brazilian folk medicine as antiseptic, antiinflammatory and haemostatic. *Aim of the study:* The effects of the administration of dried extract of the bark of *S. terebinthifolius* were investigated during pregnancy in female Wistar rats. *Materials and Methods:* Five groups of pregnant rats (n = 7-8/group) were treated orally during the phases of pregnancy: 1st to the 6th (pre-implantation period) or 7th to the 14th day (organogenic period), at doses of 0, 0.1, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹. On the 20th day of pregnancy, the animals were submitted to euthanasia and laparotomized to evaluate reproductive parameters. *Results:* The results showed that there was not any statically difference between the control and treated groups in terms of the number of alive and dead fetuses, the dam-offspring relationship, the weight and length of the fetus, the weight of the ovaries (right and left) and of the placentae, the number of implantation sites, the number of resorption sites, the number of corpora lutea and the pre- and post-implantation loss rates. *Conclusion:* It is therefore concluded that administration of dried extract of *Schinus terebinthifolius* bark did not bring about any toxic effect on pregnancy in Wistar rats.

Keywords: *Schinus terebinthifolius*; Anacardiaceae; Toxicology; Pregnancy.

1. Introduction

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) is popularly known as Pink Pepper or Pink Berries in USA and Aroeira or Cabuí, in Brazil (Pires et al., 2004). This specie is native from Argentina, Paraguay and Brazil and it is thought to have been introduced into Florida as an ornamental plant (Ewel et al., 1982).

In popular medicine, preparations of *S. terebinthifolius* bark are used to treat a variety of ailments such as ulcers, respiratory problems, wounds, tumors, skin ailments, arthritis (Morton, 1978) and present antiseptic, anti-inflammatory and haemostatic activities (Medeiros et al., 2007). Due to its astringent effect, it is used against diarrhea and hemoptysis, using 100 g.L⁻¹ of water and it drunk about 30-40mL per day. Applies also to sciatica pain, gout and rheumatism - for both, it is used 25 g.L⁻¹ and take a hot bath for 15 minutes (Balbach, 1986).

Extensive phytochemical studies on *S. terebinthifolius* demonstrated the presence of several chemicals including terpens (Campello and Marsaioli, 1975; Lloyd et al., 1977), phenols (Stahl et al., 1983; Ceruks et al., 2007), pentagalloylglucose – precursor of many complex structures of tannins (Hayashi et al., 1989) and flavonoids (Kassem et al., 2004; Degáspari et al., 2005). In addition, the chemical analysis of *Schinus terebinthifolius* bark proved the existence of anthraquinones, xanthones and free steroids (Lima et al., 2006).

The hydroalcoholic extract of the leaves of aroeira showed significant antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, addicted to an antifungal action against *Candida albicans* in concentrations of 12.6 and 6.3 mg.mL⁻¹ (Martinez et al., 1996; Martinez et al., 2000). The antioxidant activity of the methanolic extract of *S. terebinthifolius* aerial parts was well described by removing free radicals superoxide and protecting against peroxidation of microsomal membranes of rats (Velázquez et al., 2003).

The hydroalcoholic extract of *S. terebinthifolius* bark by intraperitoneal route (i.p.) in dose of 0.1 g.kg⁻¹ had a positive effect on the healing process of anastomoses of the colon (Coutinho et al., 2006), in healing of surgical wounds in bladders (Lucena et al., 2006) and, by topic route, in wounds of the back (Castelo-Branco Neto et al., 2006) in rats.

The aqueous extract of *S. terebinthifolius* leaves showed antiinflammatory activity of non-steroidal type, in the granuloma model caused by cotton in the back of

mice, by oral treatment with doses from 0.125 to 0.5 g.kg⁻¹ (Mourelle et al., 1997). In the pleurisy model, the oral pre-treatment with 0.1 g.kg⁻¹ of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves inhibited significantly the accumulation of the total leukocytes and eosinophils in mice (Cavalher-Machado et al., 2008).

Since medicinal plants are an important form of therapy in many countries, reproductive toxicity studies need to be carried out as part of the safety evaluation process of herbal medicines (Dalsenter et al., 2004). Notwithstanding the widespread use of *S. terebinthifolius* as a medicinal plant, no study investigating the effects of its preparations on reproductive function has been performed so far. Therefore, this study was conducted to assess possible toxic effects of the dried extract of the bark of *Schinus terebinthifolius* in pregnant Wistar rats, during the pre-implantation and organogenesis periods.

2. Material and Methods

2.1. Plant material and extraction

The bark of the stem of *Schinus terebinthifolius* was supply by AKSY Company (São Paulo, Brazil). A voucher specimen authenticated in the Department of Botany of the UFPE, was deposited in the Geraldo Mariz Herbarium under record number 8758. The extraction was performed by maceration air dried and 5 kg of pulverized *S. terebinthifolius* bark with 10 L of ethanol 70% (v/v) at room temperature, for 7 days and was occasionally shaken. In our laboratory, the crude ethanolic extract was evaporated to dryness under reduced pressure for total elimination of alcohol, followed by lyophilization, yielding approximately 348 g of dry residue. The lyophilized extract of *Schinus terebinthifolius* (St) was kept at room temperature until its use and suspended in distilled water.

2.3. Animals

Pregnant Wistar rats (*Rattus norvegicus* var. *albinus*), aged 2 and 3 months, weighing 138-228g were obtained from the Department of Physiology and Pharmacology at the Federal University of Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Brazil. They were maintained in standard environmental conditions (22-24 °C; 12:12 h dark/light cycle). Water and industrialized dry food (Labina[®], Purina, Brazil) were

available *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Biological Science Center of UFPE (Process n° 23076.011331/2008-52), in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.3. Experimental protocol

Observation of the presence of sperm in the vaginal smear was used to establish the 1st day of pregnancy. The animals were randomly divided into five groups (n = 7-8 per group). Group 1 (control group) received water (1 mL/100g body weight; p.o.) and groups 2, 3 and 4 received the dried extract of *Schinus terebinthifolius* at doses of 0.1, 0.25, 0.625 or 1.5625 g.kg⁻¹. Treatment was administered during two different periods of pregnancy: pre-implantation (1st to 6th day of pregnancy) and organogenesis (7th to 14th day of pregnancy).

During pregnancy, the rats were evaluated for survival, altered appearance and any clinical signs of toxicity, such as changes in food and water intake, piloerection, diarrhea, change of locomotor activity and vaginal bleeding. The maternal weight was also recorded on days 1, 7, 14 and 20. On the 20th day of pregnancy, the rats were subjected to euthanasia by cervical dislocation, laparotomized and their uterine horns removed, for determination of reproductive variables: number of alive and dead fetuses; offspring/dam relationship; absolute and relative mass of the fetuses, mass of the placentae and mass of the ovaries (right and left); length of the fetuses; number of implantations, of viable implantations and of resorptions; number of corpora lutea; implantation index (total number of implantation sites / total number of corpora lutea x 100), the number of pre-implantations (number of corpora lutea - number of viable implantations / number of corpora lutea x 100) and the post-implantation loss rate (number of implantations - number of live fetuses / number of implantations x 100). Macroscopic aspects were observed in order to detect any possible abnormalities (Costa-Silva et al., 2007).

2.4. Statistical analysis

The values were expressed as mean $\pm$ standard error of mean (SEM) or as median. One-way ANOVA followed, when necessary, by Tukey Test were used to evaluate significant differences between treated and control groups. The pre-implantation and post-implantation loss rates and the implantation indexes were

analyzed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn test, when necessary. The significance level was set at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with the aid of the software GraphPad Prism 5[®].

3. Results

During the treatment with *Schinus terebinthifolius* at doses of 0.1, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹ in the pre-implantation period and during the whole pregnancy was not recorded deaths and nor were observed visible signs of maternal toxicity. Maternal weight gain was unaffected by *S. terebinthifolius* administration at all dose levels throughout the study (Table 1). A similar lack of effect was noted in the case of food and water consumption (Figure 1).

No dead fetuses or fetuses with external malformations were observed. There were not any statistically differences between control and treated dams regarding the number of fetuses in each dam (offspring/dam relationship), fetuses, placentae and ovary (right and left) masses or the number of corpora lutea (Table 1). Likewise, treatment with *Schinus terebinthifolius* did not cause any changes in the implantation and the pre- and post-implantation loss rates (Table 1).

Similarly, the administration of *Schinus terebinthifolius* in the period of organogenesis did not induce death or visible signs of maternal toxicity during pregnancy. The body mass gain maternal and reproductive parameters evaluated were not statistically different between the groups treated and the control group (Table 2). There was no significant difference in consumption of food and water between the groups treated and the control group (Figure 2).

4. Discussion

Considering the large ethnomedicinal use of *Schinus terebinthifolius* bark, especially to treat inflammatory and haemostatic diseases, the aim of the present study was to evaluate a possible embryofetotoxic and teratogenic potential of dried extract of the bark of *Schinus terebinthifolius* in Wistar rats.

S. terebinthifolius (0.1 to 1.5625 g.kg⁻¹) did not produce any deaths or toxic clinical signs among the pregnant rats in the pre-implantation and organogenic periods, suggesting absence of maternal toxicity due to treatment. Maternal parameters such as body weight changes, in the ration and water consumption and clinical signs of toxicity allowed for a clear evaluation of the integrity of maternal homeostasis (Almeida and Lemônica, 2000).

The administration of *Schinus terebinthifolius* dried extract in the pre-implantation and organogenic periods, did not bring about death or any external malformation in the fetuses and also did not alter fetuses and placentae mass in doses of up to 1.5625 g.kg⁻¹ in rats. The ovarian mass and the number of corpora lutea in treated groups were similar to those of the control group. These findings indicate normal development of corpora lutea and suggest that production of progesterone was not influenced by treatment with *S. terebinthifolius* (Chang et al., 2002). Both the implantation index and the pre-implantation loss rate evaluate blastocyst implantation in the uterus. These parameters were similar in control and treated groups, suggesting normal reproductive capacity.

The post-implantation loss rate establishes correlations between the number of implanted blastocysts and those that have not developed (Almeida and Lemônica, 2000). When the implanted blastocysts do not develop, its are known as “resorptions” and these indicate failure in the development of the embryo. In this study, there were no statistical differences between control and treated groups so far as the resorption number and post-implantation loss rate were concerned, indicating normal development of the implanted blastocysts.

In the pre-implantation period, the embryo meets with undifferentiated cells in mitotic division. In rodents, the implantation of conceptus usually occurs on day 4 or 5 of pregnancy. The reduction in the number of cells in the embryo during this stage may induce delay in the formation of the blastocyst (Kola and Folb, 1986) and increasing in the pre- and post-implantation losses (Kvitko and Gimmler, 1986).

In the period of organogenesis, there is an intense proliferation and cell migration, tissue remodeling and rudimentary training of body structures (Brent et al., 1993). This period is characterized as the most likely to teratogenics agents and makes greater probability of occurrence of fetal malformations. The type of malformation

depends on the evolutionary stage of the embryo and the affinity of the compound by the embryonic tissue (Chang et al., 2002).

The doses used in the present study represent up to 5.2 and 15.6 times more than the used as a haemostatic (Balbach, 1986) and as an analgesic and antiinflammatory agent (Cavalher-Machado et al., 2008), respectively.

Based on the findings, concluded that oral administration of dried extract of the bark of *Schinus terebinthifolius* during periods of pre-implantation and organogenesis of the pregnancy is safe in Wistar rats. Further studies are needed to ensure the use of the plant during human gestation.

Acknowledgements

The authors would like to thank Rejane de Souza e Silva and Zenira Cosme Xavier for technical assistance and CAPES and CNPq for financial support. We also thank Simone Marques for proofreading the manuscript.

References

- Almeida, F. C. G., Lemônica, I. P., 2000. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 53-60.
- Balbach, A., 1986. *As Plantas Curam* 1 Ed., EDEL, São Paulo, Brazil, 108-109 p.
- Brent, R. L.; Gordon, W. E.; Bennett, W. R.; Beckman, D. A., 1993. Reproductive and teratologic effects of electromagnetic fields. *Reproductive Toxicology* 7, 535-580.
- Campello, J. P.; Marsaioli, A. J., 1975. Terebenthifolic acid and baurenone, new triterpenoid ketones from *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 14, 2300-2302.
- Castelo-Branco Neto, M. L.; Ribas-Filho, J. M.; Malafaia, O.; Oliveira Filho, M. A.; Czeckzo, N. G.; Aoki, S.; Cunha, R.; Fonseca, V. R.; Teixeira, H. M.; Aguiar, L. R. F., 2006. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira* 21, 17-22.

- Cavalher-Machado, S. C.; Rosas, E. C.; Brito, F. A.; Heringe, A. P.; Oliveira, R. R.; Kaplan, M. A. C.; Figueiredo, M. R.; Henriques, M. G. M. O., 2008. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology* 8, 1552–1560.
- Ceruks, M.; Romoff, P.; Fávero, O. A., Lago, J. H. G., 2007. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova* 30, 597-599.
- Chang, C. V.; Felicio, A. C.; Reis, J. E. P.; Guerra, M. O.; Peters, V. M., 2002. Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 265-269.
- Costa-Silva, J. H.; Lyra, M. M. A.; Lima, C. R.; Arruda, V. M.; Araújo, A. V.; Ribeiro e Ribeiro, A.; Arruda, A. C.; Fraga, M. C. C. A.; Lafayette, S. S. L.; Wanderley, A. G., 2007. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 122–126.
- Coutinho, I. H. I. L. S.; Torres, O. J. M.; Matias, J. E. F.; Coelho, J. C. U.; Stahlke Júnior, H. J.; Agulham, M. A.; Bachle, E.; Camargo, P. A. M.; Pimentel, S. K.; Freitas, A. C. T., 2006. Efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira* 21, 49-54.
- Dalsenter, P. R.; Cavalcanti, A. M.; Andrade, A. J.; Araujo, S. L.; Marques, M. C., 2004. Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. *Reproductive Toxicology* 18, 819–823.
- Degáspari, C. H.; Waszczynskyj, N.; Prado, M. R. M., 2005. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia Lavras* 29, 617-622.
- Ewel, J., Ojima, D. S., Karl, D. A., De Busk, W. F., 1982. “*Schinus in Successional Ecosystems of Everglades National Park T-676.*” National Park Service, South Florida Research Center, Everglades National Park, Homestead, FL.
- Hayashi, T.; Nagayama, K.; Arisawa, M.; Shimizu, M.; Suzuki, S.; Yoshizaki, M.; Morita, N., 1989. Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a paraguayan crude drug, “molle-I” (*Schinus terebinthifolius*). *Journal of Natural Products* 52, 210-211.

- Kassem, M. E. S.; El-Desoky, S. K.; Sharaf, M., 2004. Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. *Chemistry of Natural Compounds* 40, 447-450.
- Kola, I.; Folb, P.; 1986. Chlopromazine inhibits the mitotic index, cell number, and the formation of blastocyst, and delays implantation of CBA mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 76, 527-536.
- Kvitko, K.; Gimmler, M. C., 1986. Effects of intergerrimine on the implantation and intrauterine development of mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29, 223-227.
- Lima, M. R. F.; Luna, J. S.; Santos, A. F.; Andrade, M. C. C.; Sant'ana, A. E. G.; Genet, J. P.; Márquez, B.; Neuville, L.; Moreau, N., 2006. Anti-bacterial of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 137-147.
- Lloyd, H. A.; Jaouni, T. M.; Evans, S. L.; Morton, J. F., 1977. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 16, 1301-1302.
- Lucena, P. L. H.; Ribas-Filho, J. M.; Mazza, M.; Czeckzo, N. G.; Dietz, U. A.; Correa Neto, M. A.; Henriques, G. S.; Santos, O. J.; Ceschin, A. P.; Thiele, E. S., 2006. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira* 21, 44-49.
- Martinez, M. J.; Betancourt, J.; Alonso-González, N.; Jauregui, A., 1996. Screening of Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 52, 171-174.
- Martinez, M. J.; Barreiro, M. L.; Rodriguez, Z. M.; Rubalcaba, Y., 2000. Actividad antimicrobiana de um extrato fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 5, 23-25.
- Medeiros, K. C. P.; Monteiro, J. C.; Diniz, M. F. F. M.; Medeiros, I. A.; Silva, B. A.; Piuvezam, M. R., 2007. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17, 23-28.
- Morton, J. F., 1978. Brazilian pepper - Its impact on people, animals and the environment. *Economic Botany* 32, 353-359.
- Mourelle, J. A. F.; Domínguez, L. E. S.; Rodríguez, F. J. M.; Rodríguez, Z. M.; Gutiérrez, Z. P., 1997. Actividad analgésica y antiinflamatoria de un extracto hidroalcohólico de *Schinus terebinthifolius*. La Habana, 42 p.

- Pires, O. C.; Taquemasa, A. V. C.; Akisue, G.; Oliveira, F.; Araújo, C. E. P., 2004. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL₅₀) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L.). Latin American Journal of Pharmacy 23, 176-82.
- Stahl, E.; Keller, K.; Blinn, C., 1983. Cardanol, a skin irritant in pink pepper. Planta Medica 48, 5-9.
- Velázquez, E.; Tournier, H. A.; Buschiazzi, P. M.; Saavedra, G.; Schinella, G. R. , 2003. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. Fitoterapia 74, 91-97.

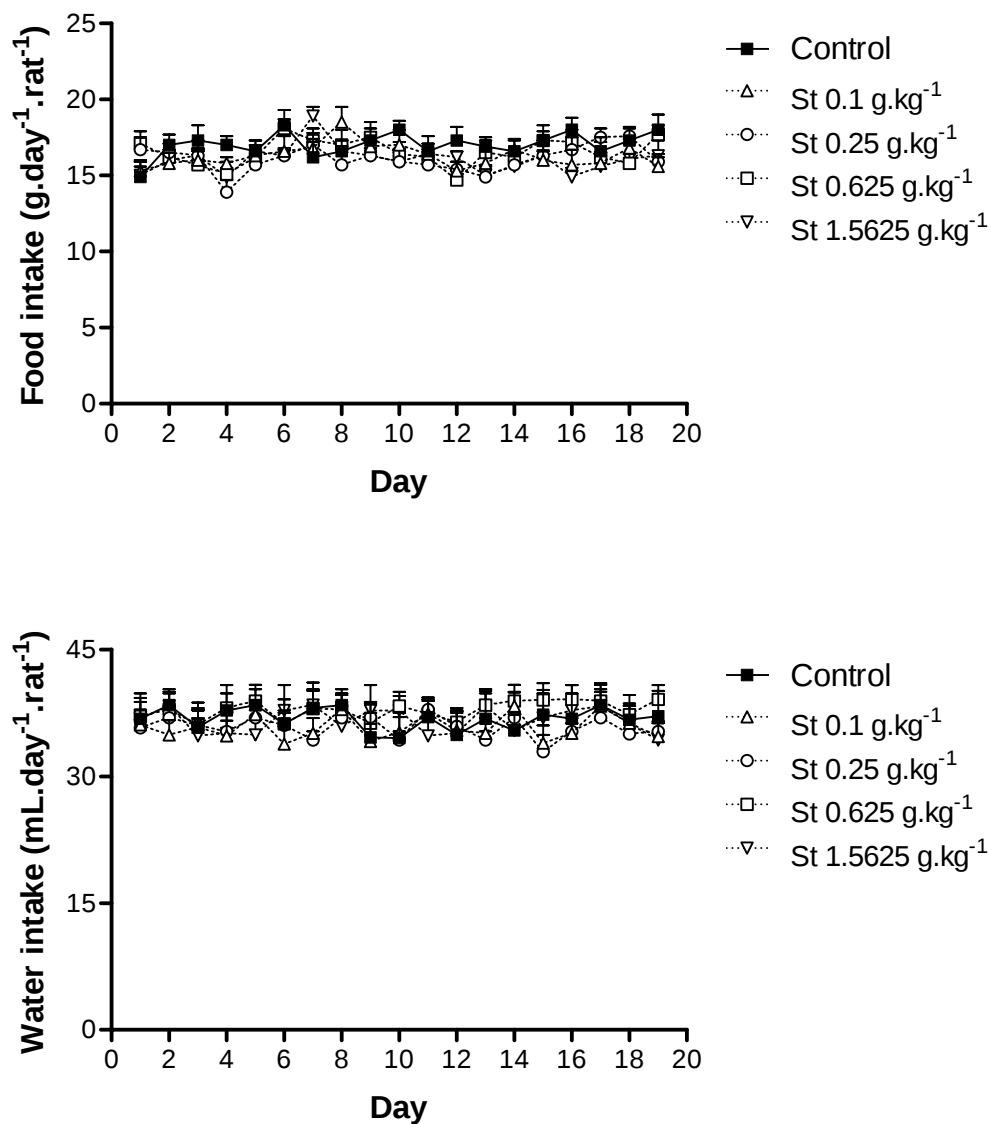


Figure 1. Daily food and water intake of Wistar rats treated with *S. terebinthifolius* dried extract (St, 0.1 to 1.5625 g.kg⁻¹, p.o.) from the 1st to 6th day of pregnancy.

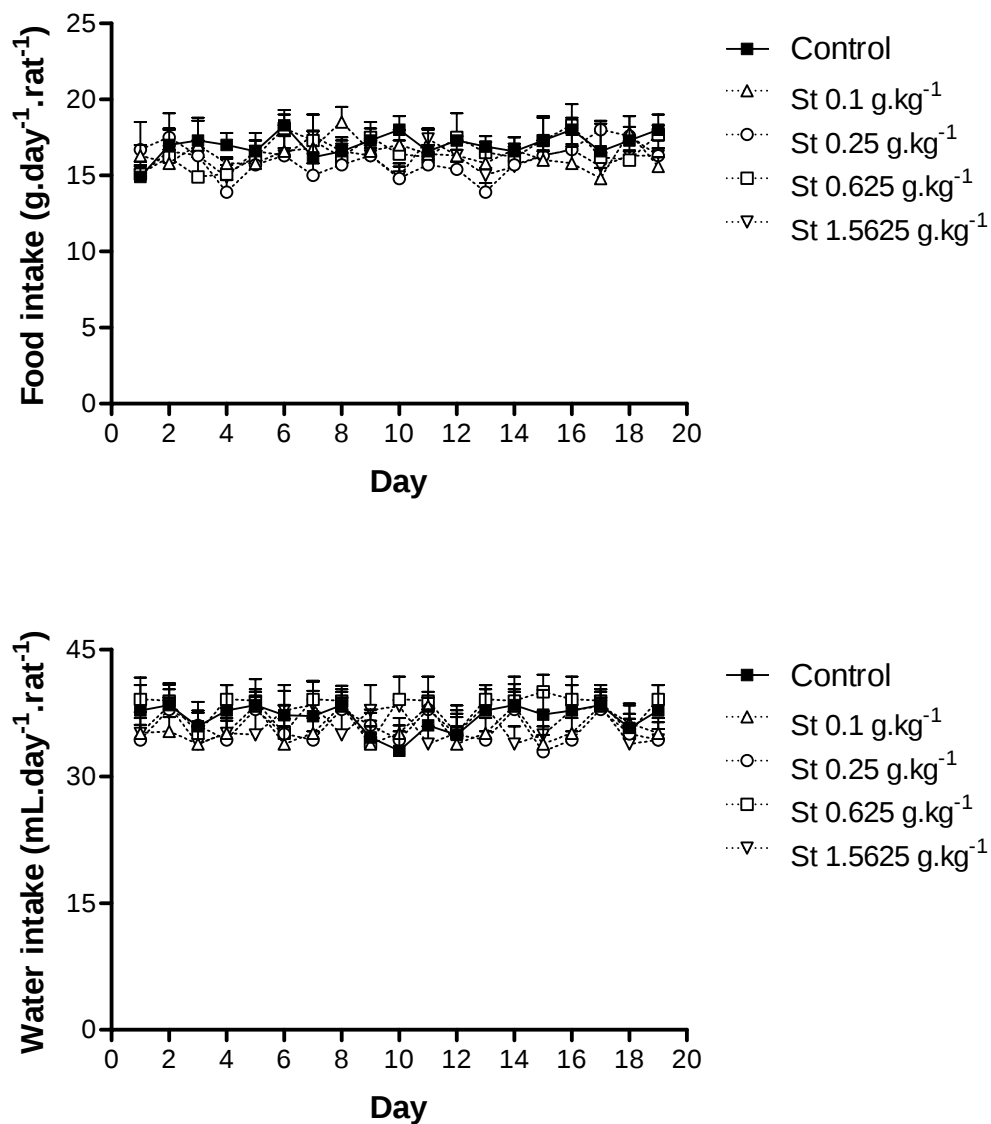


Figure 2. Daily food and water intake of Wistar rats treated with *S. terebinthifolius* dried extract (St, 0.1 to 1.5625 g.kg⁻¹, p.o.) from the 7th to 14th day of pregnancy.

Table 1: Effect of oral administration of the *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.1, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) on reproductive parameters during the pre-implantation period (1st-6th day) in pregnant Wistar rats.

REPRODUCTIVE PARAMETERS	CONTROL	St 0.1 g.kg ⁻¹	St 0.25 g.kg ⁻¹	St 0.625 g.kg ⁻¹	St 1.5625 g.kg ⁻¹
Pregnant rats	8	7	8	7	8
Mass gain in the pregnancy period (g)¹	107.1 ± 7.14	103.1 ± 9.10	108.7 ± 3.72	107.3 ± 6.21	98.6 ± 7.57
Mass gain in the pre-implantation period (g)¹	15.69 ± 0.60	19.58 ± 2.28	17.91 ± 1.22	19.71 ± 1.21	18.13 ± 2.32
Number of alive fetuses	81	61	82	75	82
Number of death fetuses	0	0	0	0	0
Offspring/dam relationship¹	11.43 ± 0.37	10.00 ± 0.73	10.25 ± 0.37	10.71 ± 0.81	10.25 ± 0.77
Length of the fetuses (cm)¹	2.91 ± 0.03	2.81 ± 0.03	2.87 ± 0.03	2.80 ± 0.03	2.86 ± 0.03
Absolute mass of the fetuses (g)¹	2.45 ± 0.05	2.37 ± 0.06	2.46 ± 0.04	2.42 ± 0.04	2.32 ± 0.05
Relative mass of the fetuses (g.100g⁻¹)¹	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.03	0.81 ± 0.02	0.79 ± 0.03	0.81 ± 0.03
Absolute mass of the placentae (g)¹	0.50 ± 0.03	0.53 ± 0.04	0.46 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.43 ± 0.01
Relative mass of the placentae (g.100g⁻¹)¹	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Absolute mass of the right ovary (mg)¹	44.04 ± 7.10	39.74 ± 4.26	41.48 ± 3.56	47.60 ± 3.28	36.50 ± 2.25
Relative mass of the right ovary (mg.100g⁻¹)¹	14.31 ± 2.20	13.20 ± 1.27	13.67 ± 1.15	15.50 ± 1.14	12.84 ± 0.94
Absolute mass of the left ovary (mg)¹	40.36 ± 5.10	44.97 ± 3.14	41.34 ± 4.45	42.61 ± 4.47	42.69 ± 4.05
Relative mass of the left ovary (mg.100g⁻¹)¹	13.15 ± 1.55	15.13 ± 1.17	13.56 ± 1.45	13.82 ± 1.47	14.97 ± 1.45
Number of implantation	88	65	87	80	99
Number of resorption	7	4	5	5	6
Number of viable implantations	81	61	82	75	93
Number of corpora lutea¹	12.25 ± 0.37	12.71 ± 0.64	12.00 ± 0.68	12.86 ± 0.46	13.13 ± 0.29
Implantation index (%)²	100	91.33	91.45	90.91	96.43
Pre-implantation loss (%)²	0	8.71	8.65	9.09	1.07
Post-implantation loss (%)²	7.69	0	4	0	14.84

The values are expressed as mean ± S.E.M¹ or as median²

No statistically different from control group (ANOVA¹ or Kruskal-Wallis Test², $p > 0.05$).

Table 2: Effect of oral administration of the *Schinus terebinthifolius* dried extract (St, 0.1, 0.25, 0.625 and 1.5625 g.kg⁻¹) on reproductive parameters during the organogenic period (7th-14th day) in pregnant Wistar rats.

REPRODUCTIVE PARAMETERS	CONTROL	St 0.1 g.kg ⁻¹	St 0.25 g.kg ⁻¹	St 0.625 g.kg ⁻¹	St 1.5625 g.kg ⁻¹
Pregnant rats	7	8	8	8	7
Mass gain in the pregnancy period (g)¹	86.71 ± 5.89	99.31 ± 7.07	85.63 ± 6.80	92.0 ± 9.35	98.39 ± 7.40
Mass gain in the organogenic period (g)¹	20.57 ± 2.15	28.00 ± 2.88	17.31 ± 4.66	19.63 ± 4.25	22.07 ± 2.69
Number of alive fetuses	71	89	90	86	76
Number of death fetuses	0	0	0	0	0
Offspring/dam relationship¹	10.14 ± 0.74	11.13 ± 0.44	11.25 ± 0.62	10.75 ± 0.45	10.86 ± 0.67
Length of the fetuses (cm)¹	2.74 ± 0.02	2.76 ± 0.03	2.74 ± 0.05	2.75 ± 0.03	2.87 ± 0.06
Absolute mass of the fetuses (g)¹	2.35 ± 0.06	2.43 ± 0.05	2.44 ± 0.04	2.41 ± 0.04	2.59 ± 0.09
Relative mass of the fetuses (g.100g⁻¹)¹	0.90 ± 0.06	0.98 ± 0.07	0.91 ± 0.03	0.99 ± 0.05	0.89 ± 0.04
Absolute mass of the placentae (g)¹	0.47 ± 0.01	0.52 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.01	0.46 ± 0.01
Relative mass of the placentae (g.100g⁻¹)¹	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.16 ± 0.01
Absolute mass of the right ovary (mg)¹	46.23 ± 2.44	43.66 ± 6.90	53.18 ± 4.69	37.08 ± 3.61	35.16 ± 2.49
Relative mass of the right ovary (mg.100g⁻¹)¹	17.38 ± 0.88	16.96 ± 2.77	19.49 ± 1.28	14.10 ± 1.03	13.33 ± 1.15
Absolute mass of the left ovary (mg)¹	48.07 ± 3.50	51.41 ± 4.83	38.41 ± 4.47	42.06 ± 2.71	47.39 ± 5.76
Relative mass of the left ovary (mg.100g⁻¹)¹	18.28 ± 1.76	18.69 ± 1.26	14.67 ± 2.38	16.16 ± 1.13	15.90 ± 1.65
Number of implantation	74	93	93	91	86
Number of resorption	3	4	3	5	7
Number of viable implantations	71	89	90	86	73
Number of corpora lutea¹	12.00 ± 0.76	12.88 ± 0.76	12.50 ± 0.50	12.38 ± 0.37	13.29 ± 0.61
Implantation index (%)²	90	89.75	96	92.31	93.33
Pre-implantation loss (%)²	10	10.67	3.85	7.50	6.67
Post-implantation loss (%)²	0	0	0	3.57	10

The values are expressed as mean ± S.E.M¹ or as median²

No statistically different from control group (ANOVA¹ or Kruskal-Wallis Test², $p > 0.05$).

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o extrato seco da casca do caule de *Schinus terebinthifolius* Raddi quando administrado por via oral em ratos Wistar:

- ✓ Não produziu morte ou efeitos tóxicos como alteração da atividade locomotora, piloereção, perda de peso corporal, alteração no consumo de água ou ração em quaisquer dos experimentos;
- ✓ Apresenta baixa toxicidade aguda em ambos os sexos;
- ✓ Não demonstrou efeitos tóxicos sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e morfológicos de ambos os sexos, em administração subcrônica por 45 dias; exceto sobre os parâmetros hematológicos dos grupos de machos tratados nas doses de 250 e 625 mg/kg, onde houve acréscimo nos valores do volume corpuscular médio (2,9 e 2,6%, respectivamente), em relação ao grupo controle. Entretanto, estas variações estão dentro dos limites fisiológicos descritos para a espécie;
- ✓ Não produziu efeitos tóxicos sobre os parâmetros reprodutivos em ratas Wistar e em seus conceptos, após tratamento no período de pré-implantação e organogênese.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.

ARAÚJO, E. L. **Aroeira da praia – Estudo farmacognóstico e da atividade biológica de *Schinus terebinthifolius*, Raddi (Anacardiaceae).** Dissertação de Mestrado do Departamento de Ciências Farmacêuticas / Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

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

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1225-1244, 2007.

BALBACH, A. **As Plantas Curam**, 1ed., Editora EDEL: São Paulo, p.108-109, 1986.

BARBIERI, G. **Testes de potencial de dano e de especificidade com *Calophya terebinthifolii* Burckhardt & Basset, 2000 (Hemiptera: Psyllidae) para o controle biológico da aroeira *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) no estado da Flórida – EUA.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental / FURB, Blumenau, 2004.

BARNES, D. G.; DOURSON, M. Reference dose (RfD): Description and use in health risk assessments. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 471-486, 1988.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. *Avaliação toxicológica*. P. 61-70. In OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

BARROW, P. C. Reproductive toxicology studies and immunotherapeutics. **Toxicology**, v. 18, p. 205-212, 2003.

BECKMAN, D. A. Mechanisms of aminoacid supply to the rat conceptus in normal and abnormal development. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 4, p. 595-599, 1997.

BENNETT, F. D., and HABECK, D. H. *Brazilian peppertree – Prospects for biological control in Florida*. In **“Proceedings of the Symposium on Exotic Pest Plants”** (T. D. Center, R. F. Doren, R. L. Hofstetter, R. L. Myers, and L. D. Whiteaker, Eds.), pp. 23–33. U. S. Dept. Interior, National Park Service, Washington, DC, 1991.

BERTOLDI, M. C. **Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. Dissertação de Mestrado do Departamento de Tecnologia de Alimentos / Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 31 n. 3, p. 277-281, 2003.

BOELSTERLI, U. A. Animal models of human disease in drug safety assessment. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 109-121, 2003.

BÓRIO, E. B. L. Contribuição ao estudo farmacognóstico da casca do caule da Aroeira *Schinus terebinthifolius* Raddi – Anacardiaceae. **Ciência e Cultura**, v. 25, n. 7, p. 631-637, 1973.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity – prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in Vitro**. v. 18, n. 2, p. 227-230, 2004.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, G. R. R; GOULART, L. O.; MONTE-MOR, R. L. M. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 127-134, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde (CNS). Resolução nº 251, de 07 de agosto de 1997. **Normas de Pesquisa com Novos Fármacos, Medicamentos, Vacinas e Testes Diagnósticos Envolvendo Seres Humanos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 211-217, 1997.

BRASIL, Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica (CNMAF). I Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica. **Relatório Final Preliminar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução-RE nº 90, de 16 de março de 2004. **Guia para Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2004.

BRENT, R. L.; GORDON, W. E.; BENNETT, W. R.; BECKMAN, D. A. Reproductive and teratologic effects of electromagnetic fields. **Reproductive Toxicology**, v. 7, p. 535-580, 1993.

BRIGGS, G. G.; FREEMAN, R. K.; YAFFE, S. J. **Drugs in pregnancy and lactation: a reference guide to fetal and neonatal risk**. 7th. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2005.

BUTLER, M. S.; Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 475–516, 2008.

CAMPELLO, J. P.; MARSAIOLI, A. J. Triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 13, n. 3, p. 659-660, 1974.

CAMPELLO, J. P.; MARSAIOLI, A. J. Terebenthifolic acid and bauerenone, new triterpenoid ketones from *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 10, p. 2300-2302, 1975.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira**. EMBRAPA-SPI, Brasília, Brasil, 640 pp., 1994.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CASTELO-BRANCO NETO, M. L.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; CZECHKO, N. G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 17-22, 2006.

CAVALHER-MACHADO, S. C.; ROSAS, E. C.; BRITO, F. A.; HERINGE, A. P.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; HENRIQUES, M. G. M. O. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1552-1560, 2008.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A. e LAGO, J. H. G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 597-599, 2007.

CLEMENTE, A. D. **Composição química e atividade biológica do óleo essencial da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. Dissertação de Mestrado do Departamento de Agroquímica/ Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

COECKE, S.; BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N.; HOET, P.; KAPOULAS, V. M.; LADSTETTER, B.; LANGLEY, G.; LEAHY, D.; MANNENS, G.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; NEMERY, B.; PELKONEN, O.; PFALLER, W.; PRIETO, P.; PROCTOR, N.; ROGIERS, V.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; SABBIONI, E.; STEILING, W.; VAN DE SANDT, J. J. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to Laboratory Animals**, suppl 1, p. 147-175, 2005.

COLLABORATIVE GROUP ON DRUG USE IN PREGNANCY (CGDUP). Medication during pregnancy: an intercontinental cooperative study. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 39, p. 185-96, 1992.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. v. 3. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brasil, p. 125-126, 1978.

COUTINHO, I. H. I. L. S.; TORRES, O. J. M.; MATIAS, J. E. F.; COELHO, J. C. U.; STAHLKE JÚNIOR, H. J.; AGULHAM, M. A.; BACHLE, E.; CAMARGO, P. A. M.; PIMENTEL, S. K.; FREITAS, A. C. T. Efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 49-54, 2006.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.

EWEL, J., OJIMA, D. S., KARL, D. A., DE BUSK, W. F. **Schinus in Successional Ecosystems of Everglades National Park T-676**. National Park Service, South Florida Research Center, Everglades National Park, Homestead, FL, 1982.

FAUSTMAN, E. M.; ALLEN, B. C.; KAVLOCK, R. J.; KIMEL, C. A. Dose-response assessment for developmental toxicity: I. Characterization of database and determination of no observed adverse effect levels. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 23, p. 478-486, 1994.

FEITOSA, E. N.; LIMA, D. K. S.; SANTOS, E. F. P.; LIMA, C. B.; SOUZA, M. A. *Fitoterapia como uma Alternativa na Prevenção de Tratamento de Vulvovaginites*. In: **7º Congresso Brasileiro dos Conselhos de Enfermagem, 2004, Fortaleza**. Rio de Janeiro : Conselho Federal de Enfermagem, 2004.

FERRITER, A. *Brazilian Pepper Management Plan for Florida*. In: **Recommendations from the Brazilian Pepper Task Force Florida Exotic Pest Plant Council**, 1997.

FLEIG, M. **Anacardiaceae. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul**. Boletim do Instituto de Biociências, v. 18, n. 42, 72 pp., 1987.

FLEIG, M.; KLEIN, R. M. **Anacardiáceas. Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí, Brasil, 64 pp., 1989.

FONSECA, M. R. C. C.; FONSECA, E.; BERGSTEN-MENDES, G. Prevalência do uso de medicamentos na gravidez: uma abordagem farmacoepidemiológica. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, p. 205-212, 2002.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S.; Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

FRITZ, H.; GEISE, K. Evaluation of the teratogenic potential of chemicals in the rats. **Pharmacology**, v. 40, p. 1-28, 1990.

GENEROSO, W. M. RUTLEDGE, J. C.; CAIN, K. T.; HUGHES, L. A.; DOWNING, D. J. Mutagen-induced fetal anomalies and death following treatment of females within hours after mating. **Mutation Research**, v. 199, p. 175-181, 1988.

GIAVINI, E.; LEMÔNICA, I. P.; LOU, Y. et al. Induction of micronuclei and toxic effects in embryos of pregnant rats treated before implantation with anticancer drugs: Cyclophosphamide, Cis-platinum, Adriamycin. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 10, p. 417-426, 1990.

GOLDMAN, J. M.; LAWS, S. C.; BALCHAK, S. K.; COOPER, R. L.; KAVLOCK, R. J. Endocrine-disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, p. 35-196, 2000.

GONÇALVES, A. L., ALVES-FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GUERRA, M. J. M.; BARREIRO, M. L.; RODRÍGUEZ, Z. M.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 5, n. 1, p. 23-25, 2000.

GRAY, L. E.; WILSON, V.; NORIEGA, N.; LAMBRIGHT, C.; FURR, J.; STOKER, T. E.; LAWS, S. C.; GOLDMAN, J.; COOPER, R. L.; FOSTER, P. M. D. Use of the Laboratory Rat as a Model in Endocrine Disruptor Screening and Testing. **Journal of the Institute for Laboratory Animal Research**, v. 45, n. 4, p. 425-437, 2004.

HAYASHI, T.; NAGAYAMA, K.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a paraguayian crude drug, "molle-I" (*Schinus terebinthifolius*). **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 1, p. 210-211, 1989.

HENRY, A.; CROWTHER, C. Patterns of medication during, and prior to pregnancy: the MAP study. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 40, p. 165-172, 2000.

HOUCK, K. A., KAVLOCK, R. J. Understanding mechanisms of toxicity: Insights from drug discovery research. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 277, p. 163–178, 2008.

JAIN, M. K.; YU, B. Z.; ROGERS, J. M.; SMITH, A. E.; BOGER, E. T. A.; OSTRANDER, R. L.; RHEINGOLD, A. L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A₂ from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 537-547, 1995.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C. L.; RESENDE, M. A. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 632-637, 2007.

JOHANN, S.; SILVA, D. L.; MARTINS, C. V. B.; ZANI, C. L.; PIZZOLATTI, M. G.; RESENDE, M. A. Inhibitory effect of extracts from Brazilian medicinal plants on the adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2459–2464, 2008.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JONES, D. *Biology of Brazilian Pepper*. In: CHAIRMANN, Dan Clark. **Brazilian Pepper Management Plan for Florida**. Florida: Florida Exotic Pest Plant Council, p. 5-9, 1997.

KAISTHA, K. K.; KIER, L. B. Structural studies on the triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 12, p. 1136-1139, 1962.

KASSEM, M. E. S.; EL-DESOKY, S. K.; SHARAF, M. Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 5, p. 447-450, 2004.

KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. 2^a ed., v. 1 and 2. New York: Raven Press, 1994.

LAM, K. S.: New aspects of natural products in drug discovery. **TRENDS in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LAMPE, K. F.; MCCANN, M. A. **AMA Handbook of Poisonous and Injurious Plants**. American Medical Association, Chicago, 1985.

LAWRENCE, B. M. A discussion of *S. molle* and *S. terebinthifolius*. **Perfumer & Flavorist**, v. 9 (5), p.65-9,1984.

LEMÔNICA, I. P. *Teratogênese Experimental e Sua Aplicação em Humanos*. p. 19-40; In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M. T. V.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Manual de Teratogênese**. 1 ed., Porto Alegre: Universidade/ UFRGS , 2001.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MÁRQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 137-147, 2006.

LLOYD, H. A.; JAOUNI, T. M.; EVANS, S. L.; MORTON, J. F. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 8, p. 1301-1302, 1977.

LOOMIS, M. D.; HAYES, A. W. **Loomis's Essentials of Toxicology**, 4ed. California: Academic Press, 1996.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, 2ed., v. 1, Nova Odessa, SP: editora Platarum, p. 8 e 172, 1998.

LUCENA, P. L. H.; RIBAS-FILHO, J. M.; MAZZA, M.; CZECZKO, N. G.; DIETZ, U. A.; CORREA NETO, M. A.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J.; CESCHIN, A. P.; THIELE, E. S. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 44-49, 2006.

MARTINEZ, M. J.; ALONSO-GONZÁLEZ, N.; BADELL, J. B. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebenthifolius* Raddi (copal). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 1, n. 3, p. 37-39, 1996.

MARTINEZ, M. J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, N.; JAUREGUI, A. Screening of Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 171-174, 1996.

McCHESNEY, J., D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

MELO-JÚNIOR, E. J. M.; RAPOSO, M. J.; LISBOA NETO, J. A.; DINIZ, M. F. A.; MARCELINO JÚNIOR, C. A. C.; SANT'ANA, A. E. G. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: Microbiological and microscopic analysis. **Phytomedicine**, v. 9, p. 109-116, 2002.

MORTON, J. F. Brazilian pepper – Its impact on people, animals and environment. **Economic Botany**, v. 32, n. 4, p. 353-359, 1978.

MORTON, D. M. Importance of species selection in drug toxicity testing. **Toxicological Letters**, v. 102-103, p. 545-550, 1998.

MOURELLE, J. A. F.; DOMÍNGUEZ, L. E. S.; RODRÍGUEZ, F. J. M.; RODRÍGUEZ, Z. M.; GUTIÉRREZ Z. P. Actividad analgésica y antiinflamatoria de un extracto hidroalcohólico de *Schinus terebinthifolius*. **La Habana**, 42 p., 1997.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M.: Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NUNES-JÚNIOR, J. A. T.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; Czczko, N. G.; INÁCIO, C. M.; NEGRÃO, A. W.; LUCENA, P. L. H.; Moreira, H.; WAGENFUHR-JÚNIOR, J.; CRUZ, J. J. Avaliação do Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (AROEIRA) no Processo de Cicatrização da Linea Alba de Ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 8-15, 2006

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 420. **Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure**. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. **Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 425. **Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure**. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2001.

PECKOLT, T. **História das plantas medicinaes e uteis do Brazil contendo a descrição botânica, cultura, partes usadas, composição chimica, seu emprego em diversas moléstias, usos industriaes, etc..** v. 2. Rio de Janeiro: Typ. Laemmert, 1889.

PIERIBATTEST, J.C.; CONAN, J.Y.; GRODIN, J.; VICENT, E.J.; GUERERE, M. Contribution a l'étude chimique des baies roses de bourbon. **Annales des Falsifications de L'expertise et Toxicologique**, v. 74, p. 11-16, 1981.

PIRES, O. C.; TAQUEMASA, A. V. C.; AKISUE, G.; OLIVEIRA, F.; ARAÚJO, C. E. P. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL₅₀) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum* L.). **Latin Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 2, p. 176-82, 2004.

PRIETO, P.; BAIRD, A. W.; BLAAUBOER, B. J.; CASTELL RIPOLL, J. V.; CORVI, R.; DEKANT, W.; DIETL, P.; GENNARI, A.; GRIBALDO, L.; GRIFFIN, J. L.; HARTUNG, T.; HEINDEL, J. J.; HOET, P.; JENNINGS, P.; MAROCCHIO, L.; NORABERG, J.; PAZOS, P.; WESTMORELAND, C.; WOLF, A.; WRIGHT, J.; PFALLER, W. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 34, n. 3, p. 315-41, 2006.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C.: Biologia Química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**, v. 43, n. 2, p. 86-101, 1998.

QUEIRES, L. C. S.; RODRIGUES, L. E. A. Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos da Aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, n. 2, p. 247-253, 1998.

QUEIRES, L. C.; FAUVEL-LAFÈTVE F.; TERRY, S.; DE LA TAILLE, A.; KOUYOUMDJIAN, J. C.; CHOPIN, D. K.; VACHEROT, F.; RODRIGUES, L. E.; CRÉPIN, M. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. **Anticancer Research**, v. 26, n. 1 A, p. 379-387, 2006.

RIBAS, M. O.; SOUSA, M. H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 21, n. 53, p. 245-252, 2006.

RUBIN, P. **Prescribing in Pregnancy**. 2ed. London: BMJ Publications, 1995.

RUIZ, A. R.; DE LA TORRE, R. A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 123-127, 1996.

SANTOS, W. O.; REBOUÇAS, L. M. C.; SIQUEIRA, M. M. A.; CARVALHO, D.; ALENCAR, J. W. Estudo químico de *Schinus terebinthifolius*, Raddi. **Ciência e Cultura**, v. 38, n. 7, p. 602, 1986.

SANTOS, O. J.; RIBAS-FILHO, J. M.; CZECZKO, N. G.; CASTELO-BRANCO NETO, M. L.; NAUFEL JR, C.; FERREIRA, L. M.; CAMPOS, R. P.; MOREIRA, H.; PORCIDES, R. D.; DOBROWOLSKI, S. Avaliação do extrato de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 39-45, 2006.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; COSTA, S. S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 563-568, 2005.

SCHÜLER-FACCINI, L.; LEITE, J. C. L.; SANSEVERINO, M. T. V.; PERES, R. M. Avaliação de teratógenos na população brasileira. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 65-71, 2002.

SCHWETZ, B. A.; MORRISSEY, R. E.; WELSCH, F.; KAVLOCK, R. J. In vitro teratology. **Environmental Health Perspectives**, v. 94, p. 265-268, 1991.

SILVA, L. B. L. **Preparação e avaliação biofarmacêutica de formas semi-sólidas da aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius*, Raddi)**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

SOCIETY OF TOXICOLOGY, Acessando: **www.toxicology.org**, 2008.

STAHL, E. Pink pepper, a dangerous exotic spice? **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 122, n. 7, p. 337-40, 1982.

STAHL, E.; KELLER, K.; BLINN, C. Cardanol an cutaneous irritant of *Schinus terebinthifolius*, Raddi. **Planta Medica**, v. 48, p. 5-9, 1983.

TOMLINSON, P. B. **The Biology of Trees Native to Tropical Florida**. Harvard University Printing Office, Allston. 480 p., 1980.

TORRES, D. M. G. **Catálogo de Plantas Medicinales (y Alimenticias y Utiles) Usadas en Paraguay**. Asunción, 1981.

TREVAN, J. W. The error on determination of toxicity. **Proceedings of the Royal Society**, v. 101 B, p. 483-514, 1927.

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

UKELIS, U.; PETER-JUÜRGEN, K.; OLEJNICZAK, K.; MUELLER, S. O. Replacement of *in vivo* acute oral toxicity studies by *in vitro* cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 51, p.108–118, 2008.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 2, p. 93-98, 2006.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p. 91-97, 2003.

WEBSTER, W. S.; FREEMAN, J. A. D. Is this drug safe in pregnancy? **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 619-629, 2001.

WITORSCH, R. J. Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 118-130, 2002.

WORKMAN, R. History of *Schinus* in Florida. In: Workman, R. (ed.). ***Schinus – Technical Proceedings of Techniques for Control of Schinus in South Florida: A Workshop for Natural Area Managers***. The Sanibel-Captiva Conservation Foundation, Inc., Sanibel. pp. 3-6, 1979.