

PAULO ALEX BEZERRA SALES

**TOXICIDADE REPRODUTIVA E SISTÊMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DE VAGENS DE *Samanea tubulosa* (Benth.) EM RATAS WISTAR**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TERESINA-PIAUÍ
2011**

Sales, Paulo Alex Bezerra

Toxicidade reprodutiva e sistêmica do extrato hidroalcoólico de vagens de *Samanea tubulosa* (Benth.) em ratas Wistar. Paulo Alex Bezerra Sales. Teresina, 2011. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Piauí – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

Orientador: Amilton Paulo Raposo Costa

1. Bordão de velho 2. Aborto. 3. Útero. 4. Estrógeno 5. Ciclo estral. 6. Gestação

PAULO ALEX BEZERRA SALES

**TOXICIDADE REPRODUTIVA E SISTÊMICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE VAGENS DE *Samanea tubulosa* (Benth.) EM RATAS
WISTAR**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal

Área de Concentração: Sanidade Animal e Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TERESINA-PIAUÍ
2011**

**TOXICIDADE REPRODUTIVA E SISTÊMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DE VAGENS DE *Samanea tubulosa* (Benth.) EM RATAS WISTAR**

Paulo Alex Bezerra Sales

Dissertação aprovada em: 18/02/2011

Banca examinadora:

Prof^o Dr. Amilton Paulo Raposo Costa.

DMV/ CCA – UFPI – Orientador

Prof^a.Dr^a Maria Zenaide Lima Chagas Moreno Fernandes.

Departamento de Bioquímica e Farmacologia/ CCS – UFPI

Examinadora interna

Prof^a.Dr^a Rita de Cássia da Silveira e Sá

Departamento de Fisiologia e Patologia/CCS-UFPB

Examinadora externa

À meu Deus que sempre foi fiel em suas promessas, que me concede a coragem, força e sabedoria necessária para seguir em frente ;

À minha esposa **Dária Sales** pelo cuidado incondicional, que sempre esteve ao meu lado me apoiando em meus sonhos, obrigado pelo seu grande amor;

Aos meus pais **Antônio Bitar** e **Liliane Carvalho**, os meus queridos irmãos **Adriano** e **Edlane** e ao meu amado sobrinho **Vinicius** que sempre acreditaram em mim, e que me deram todo suporte para que chegasse até aqui, vocês sempre serão meu alicerce;

Aos meus **Incríveis** amigos;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, autor da vida, pela capacidade de adquirir conhecimento, pela sabedoria para lidar com os desafios e adversidades próprios desse caminho que me propus a seguir, a ELE toda honra e glória;

Ao Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa pelo seu conhecimento compartilhado e orientação desta dissertação, fazendo-se presente em cada uma de suas etapas, desde a elaboração do projeto de pesquisa até a execução do mesmo, deste modo, minha admiração e respeito tornam-se crescentes;

Ao Prof. Dr. Gregório Elias Nunes Viana, pela colaboração no desenvolvimento tanto deste trabalho como também daqueles na iniciação científica, com seus ensinamentos, paciência e disposição;

À Prof^a. Dr^a. Adelina Martha Reis pela hospitalidade e orientação proporcionadas no período em que estive sob sua supervisão no Instituto de Ciências Biológicas ICB/UFMG;

Ao Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, pela orientação no processo de leitura de lâminas, o que foi imprescindível para o desfecho do projeto;

Ao Funcionário Davi de Souza Costa por sua inestimável ajuda, cedendo-me, sempre que solicitado, animais para a pesquisa;

Aos meus pais Antônio Bitar e Liliane Carvalho por terem sido contínuo apoio em todos esses anos, com seu amor incondicional, suas renúncias em meu favor, suas orações, com seus incentivos para que eu trilhasse a busca pelo crescimento e pelos valores a mim transmitidos;

À minha querida e amada esposa Dária Sales, presente durante esses quase dez anos, por seu apoio e incentivo em todos os passos que me fizeram dar este grande passo, compreendendo as minhas ausências, compartilhando dos meus sonhos e me ajudando a conquistá-los, eu te amo;

Aos meus queridos irmãos e sobrinho Adriano, Carla Edlane e Vinicius, respectivamente, pelo incentivo e carinho constantes em todos esses anos de convívio familiar, tornando-se participantes desta conquista;

Aos meus sogros José Carvalhêdo Lima e Amparo Pessoa Lima, por sempre torcerem por mim e pelas orações em meu favor;

Às queridas amigas e colaboradoras Indira Régia, Tatiane Novaes, Janylla Guerra e Melka Sá, pela inestimável ajuda na execução desse projeto, dispondo sempre de seus auxílios quando solicitadas somados às constantes palavras de ânimo;

Aos queridos Ricardo Abílio, Caliandra Bona e Aline Andrade, amigos de turma, de grupos de estudo no período das disciplinas, pelo apoio mútuo nos momentos mais difíceis e desafiadores, “ombros” com os quais aprendi a contar;

Aos grandes amigos (Incríveis) Francisco Leite, Kleverton Soares, Tátilla Luz e André Braga, pelo companheirismo e amizade que ultrapassaram o âmbito da universidade, por me acompanharem e visualizarem juntamente comigo essa conquista. O carinho, torcida e respeito dedicados a mim são inteiramente recíprocos;

Aos meus amigos Wesley Santos e Osnildo Araújo por sempre torcerem e acreditarem em mim e que com orações e palavras oportunas ajudaram-me a conquistar essa vitória;

Aos colegas pós-graduandos Luciano, Bethânia, Vicente, Lauro e Marina por sempre colaborarem quando requisitados;

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação em Ciência Animal da UFPI, e aos funcionários do Departamento de Morfofisiologia Veterinária pelo apoio a mim despendido;

Aos professores e funcionários do Setor de Patologia pela grande ajuda prestada;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro durante o mestrado e também por proporcionar, através do Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD), a realização deste mestrado sanduíche no Instituto de Ciências Biológicas-ICB da Universidade Federal de Minas Gerais;

A todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a conclusão desta pesquisa com sugestões e críticas;

MUITO OBRIGADO!!!

RESUMO

SALES, P. A. B. **TOXICIDADE REPRODUTIVA E SISTÊMICA DO EXTRATO DE VAGENS DE *Samanea tubulosa* (benth.) EM RATAS.** 2011.52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

Samanea tubulosa, conhecida popularmente como Bordão-de-Velho, tem sido amplamente utilizada na alimentação animal, sendo o seu fruto muito consumido pelo gado bovino devido a sua palatabilidade. Seus ramos são forrageiras, com alto teor de proteína bruta, sendo também utilizadas no tratamento de infecções cutâneas, inflamações gástricas e infestações parasitárias. Estudos constataram também atividade hemolítica pronunciada, porém existem poucas informações quanto à toxicidade da *S. tubulosa*. Esse trabalho teve por objetivo avaliar possíveis efeitos do extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa* sobre a reprodução de ratas Wistar, avaliando os seguintes parâmetros: toxicidade gestacional, atividade estrogênica e antiestrogênica, efeitos sobre o ciclo estral e toxicidade sistêmica. Protocolo I (toxicidade gestacional): Ratas Wistar prenhes foram tratadas com dose de 75mg. 100g⁻¹ peso corporal (pc) de extrato de *S. tubulosa* por via gástrica, enquanto o grupo controle (n=8) recebeu 1mL.100g⁻¹ pc de solução salina pela mesma via, por 19 dias. Procedeu-se a eutanásia dos animais ao 20º dia e as seguintes variáveis foram analisadas: peso corporal fetal, peso dos fetos e placentas, quantidade de corpos lúteos, pontos de reabsorções, fetos vivos e mortos, e número de implantações embrionárias. O Protocolo II (atividade estrogênica e antiestrogênica): Grupo 1 (salina + óleo de milho), Grupo 2 (salina + estradiol, n=8), Grupo 3 (extrato + óleo, n=8) e Grupo 4 (extrato + estradiol, n=8). Protocolo III (ciclo estral e toxicidade sistêmica): foram utilizadas 16 ratas Wistar, sendo oito em cada grupo. As ratas foram examinadas diariamente, entre 8:00 e 9:00 h, por 30 dias quanto à fase do ciclo estral posteriormente sendo eutanaziadas para a avaliação sistêmica. O extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa*, na dose estudada, apresentou toxicidade fetal causando malformações, perdas embrionárias pós implante e diminuição pronunciada do peso da prole ao nascer. Houve o aumento da fosfatase alcalina com possível origem do tecido ósseo. Não houve diferença estatística significativa no número de corpos lúteos e de implantações. Também não foi constatada atividade estrogênica, mas foram observados indícios de toxicidade sobre o útero.

Palavras-chave: Bordão de velho, aborto, útero, estrógeno, ciclo estral, gestação

ABSTRACT

SALES, P. A. B. **REPRODUCTIVE AND SYSTEMIC TOXICITY OF THE SAMANEA TUBULOSA (BENTH.) EXTRACT IN RATS.** 2011.54f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

Samanea tubulosa, a plant popularly known as Bordão-de-Velho, has been widely used in animal feed being its fruits eaten by cattle due to its palatability. Its branches are forage with high crude protein content, also being used to treat skin infections, gastric inflammations and parasitic infestations and according to some studies, *S. tubulosa* presents also pronounced hemolytic activity, however there is little information about the toxicity from *S. tubulosa*. This work aimed to evaluate possible effects of the extract of *Samanea tubulosa* on reproduction of Wistar rats, evaluating the following parameters: gestational toxicity, estrogenic and antiestrogenic activity, effects on the estrous cycle and systemic toxicity. Protocol I (gestational toxicity): Pregnant Wistar rats were treated with dose at $75\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ body weight (bw) of *Samanea tubulosa* extract, intragastrically, whereas the control group received $1\text{ml}\cdot 100\text{g}^{-1}$ bw of saline by the same route for 19 days. Proceeded to the euthanasia of animals at day 20 and the following variables were analyzed: fetal body weight, weight of fetuses and placentas, number of corpora lutea, resorption points, live and dead fetuses and number of embrionic implantations. Protocol II (estrogenic and antiestrogenic activity): Group 1 (saline + corn oil, n=8), Group 2 (saline + estradiol, n=8), Group 3 (extract + oil, n=8) and Group 4 (extract + estradiol, n=8). Protocol III (estrous cycle and systemic toxicity): Were used 16 female Wistar rats, eight in each group. The rats were examined daily between 8:00 and 9:00 h for 30 days about the stage of the estrous cycle, then they was euthanized to systemic evaluation. The hydro alcoholic extract of *Samanea tubulosa* in the dose studied, showed fetal toxicity causing malformations, embryonic loss after implantation and pronounced decrease in birth weight of offspring. There was an increase in alkaline phosphatase with a possible origin of the bone tissue. There was no statistically significant difference in the number of corpora lutea and number of deployments. Also was not found estrogenic activity, but signs of toxicity were observed on the uterus.

Keywords: Abortion, fetal toxicity, uterus, estrogen, estrous cycle, pregnancy.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Peso placentário do grupo controle e tratado com extrato hidroalcoólico de <i>Samanea tubulosa</i> (EHST).....	25
Tabela 2	Número de corpos lúteos e implantações encontradas no grupo controle e tratado c/ EHST.....	26
Tabela 3	Número de fetos nascidos vivos e mortos do grupo controle e tratado com EHST.....	26
Tabela 4	Índice de perdas pré-natal entre o grupo controle e tratado com EHST.....	26

CAPÍTULO II

Tabela 1	Parâmetros bioquímicos de ratas tratadas com solução salina (controle) e extrato hidroalcoólico de <i>S. tubulosa</i> na dose de 75mg/100g durante 30 dias (valores médios \pm EPM).....	36
Tabela 2	Peso dos órgãos avaliados (adrenais, coração, fígado, baço, pulmão, rins, ovários e útero) em ratas submetidas aos tratamentos com salina e extrato hidroalcoólico de <i>S. tubulosa</i> (valores médios \pm EPM).....	37

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Pesos dos fetos em ratas submetidas aos tratamentos com solução salina e o extrato hidroalcoólico de <i>Samanea tubulosa</i>	23
Figura 2A/2B	Fetos dos grupos controle (C) e extrato tratado com EHST (E), evidenciando as diferenças no tamanho dos mesmos.....	24
Figura 3	Fetos tratados com Extrato de <i>S. tubulosa</i> com apresentação de má formação fetal de ordem morfológica.....	24
Figura 4	Presença de placentas sem feto, indicativas de reabsorções fetais no grupo tratado com o extrato hidroalcoólico de <i>S. tubulosa</i>	25

CAPÍTULO II

Figura 1	Avaliação da atividade estrogênica e antiestrogênica do extrato hidroalcoólico de <i>Samanea tubulosa</i>	36
Figura 2	Peso dos ovários de ratas submetidas aos tratamentos com solução salina e o extrato hidroalcoólico de <i>Samanea tubulosa</i>	38
Figura 3	Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina de ratas submetidas aos tratamentos com solução salina e o extrato hidroalcoólico de <i>Samanea tubulosa</i>	38

LISTA DE ANEXOS

ANEXO

A – Instruções aos autores do periódico <i>Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia</i> (ISSN 0102-0935 versão impressa), segundo os quais foram formatados e submetidos para publicação os artigos dos dois capítulos desta dissertação.....	48
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

g	Gramas
µg	Micrograma
Pc	peso corporal
mg	miligrama(s)
ml	mililitros(s)
Kg	Quilogramas
Nº	número
°C	graus celsius
h	Horas
Tx	Taxa
p	probabilidade, nível de significância
VO	via oral
%	Porcento
RE α	receptor de estrógeno alfa
Re β	receptor de estrógeno beta
Biotex	Biotério de experimentação
UFPI	Universidade Federal do Piauí
RPM	rotações por minuto
EPM	erro padrão da média
TGO	transaminase glutâmico oxalacética
TGP	transaminase glutâmico pirúvica
E ²	Estradiol
DI	diestro I

DII	diestro II
MS	matéria seca
FDN	fibra em detergente neutro
FDA	fibra em detergente ácido
CNF	carboidratos não fibrosos
PB	proteína bruta

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3 CAPÍTULO I: Estudo da toxicidade do extrato hidroalcoólico de <i>Samanea tubulosa</i> na gestação de ratas Wistar	18
4 CAPÍTULO II: Estudo da atividade estrogênica e toxicidade sistêmica do extrato hidroalcoólico da <i>Samanea tubulosa</i>.....	29
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA.....	44
ANEXO.....	46

1 INTRODUÇÃO

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS; BOLSANI e BARREIRO, 2006).

No Brasil, a utilização de plantas como meio curativo é altamente difundida e popular. De acordo com Gesler (1992), produtos fitoterápicos são usados muitas vezes erroneamente por serem considerados seguros pelo fato de serem “naturais”. No entanto, esses produtos contêm princípios bioativos com potencial para causar efeitos deletérios (BENT e KO, 2004).

Estima-se que aproximadamente 5 a 15% de um total de 250.000 espécies de plantas superiores tenham sido sistematicamente investigadas para a presença de compostos bioativos (CRAGG; NEWMAN, 1999), o que demonstra a importância de ser dada continuidade a esses estudos (ALEXANDROVA et al., 2000).

Pesquisas realizadas por fabricantes de produtos fitoterápicos mostraram que 55% desses produtos são vendidos ilegalmente e sem qualquer tipo de receita, onde prometem tratar, prevenir e curar diversas doenças (MORRIS, 2003).

Sabemos que diversas plantas utilizadas na alimentação animal ainda precisam de estudos mais aprofundados, pois várias destas têm sido incriminadas por manifestações sintomatológicas indesejadas nos animais que as consomem, como retenção placentária, abortos, dentre outros problemas, sejam eles de ordem reprodutiva ou não, podendo levar o animal ao óbito.

Muitas plantas, no Estado do Piauí, são utilizadas popularmente com indicações específicas para alterações do ciclo menstrual, como contraceptivo e abortivo. Tais indicações nos levam a suspeitar de atividade estrogênica ou embriotóxica dessas plantas. Sabendo-se que muitas delas são consumidas pelos animais domésticos e outras são utilizadas para tratamento de suas enfermidades, faz-se necessário a utilização de protocolos específicos para verificar tais efeitos.

Esta pesquisa foi realizada com objetivo de avaliar os possíveis efeitos do extrato hidroalcoólico de *Samanea tubulosa* sobre a reprodução de ratas Wistar, a partir da análise dos seguintes parâmetros: atividade estrogênica e antiestrogênica, efeito sobre o ciclo estral e toxicidade sistêmica.

Dentro desta perspectiva esta dissertação encontra-se estruturalmente subdividida em duas partes: Parte I consiste da introdução e referencial teórico, redigida segundo as normas editoriais do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí. A Parte II corresponde aos capítulos 1 e 2, representados pelos artigos científicos: Estudo da toxicidade reprodutiva do extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa* em ratas Wistar e Estudo da atividade estrogênica e toxicidade sistêmica do extrato hidroalcoólico da *Samanea tubulosa*, que estão de acordo com as normas da revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, à qual serão submetidos para publicação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A espécie *S. tubulosa* é conhecida no Piauí, assim como em Alagoas, Maranhão, Paraíba, Pernambuco e Sergipe como bordão-de-velho; na Bahia, samaneiro e sete-cascas; no Ceará, barba-de-velho e bordão-de-velho; em Mato Grosso e em Mato Grosso do Sul, abobreira, alfarobo, farinha-seca, feijão-cru, ingá-de-pobre, pau-de-cangaia e sete-cascas. Esta espécie pertence à família Leguminosae (Mimosoideae), sendo uma árvore de grande porte, que pode atingir de 4 - 18 metros de altura e 25 - 45 cm de diâmetro. Os frutos são do tipo vagem, séssil, indeiscente, de 10 - 18 cm de comprimento, com 20 - 30 sementes (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2007).

Machado (2005) cita que a produção média por planta de *S. tubulosa* é de 34 Kg ao longo do ano. Oliveira (2009) fala de sua importância como produtora de forragens e comenta que devido à sua composição química, demonstra grande potencial como ingrediente na dieta para ruminantes.

Uma das grandes preocupações de se realizar estudos em plantas com grande potencial para alimentação animal e aquelas que são usadas como fitoterápico, se deve ao fato do pouco conhecimento de seus efeitos sobre o organismo. É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas medicinais, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas. Muitos medicamentos utilizados pela indústria farmacêutica são de origem vegetal, chegando a 25% dos que são prescritos e em torno de 121 substâncias ativas usadas para tratamento ou prevenção de doenças (HAMBURGUER; HOSTETTMANN, 1991).

Muitos produtos naturais oriundos de plantas são usados na terapêutica humana e de animais, o que justifica o interesse na investigação de plantas que apresentem propriedades farmacológicas relevantes. Simons; Grinwich (1989) realizaram estudos para verificar a ocorrência de esteróides em plantas utilizando a técnica de radioimunoensaio, sendo estudadas 128 plantas de mais de 50 famílias, onde o resultado foi positivo para 109 dessas. Androsterona e progesterona foram encontradas em mais de 80 % das espécies estudadas, testosterona e diidrotestosterona em 70%, e estrogênios como estrona e 17β estradiol em 50% das espécies. Atualmente uma das alternativas para suprir ou inibir a ação hormonal de estrógenos no organismo, se faz através do uso de substâncias denominadas de fitoestrogens, que possuem atividade biológica semelhante ao estrógeno. Estudos já evidenciaram que os

fitoestrogenos são compostos fenólicos heterocíclicos com similaridades estruturais aos dos estrógenos sintéticos e naturais (CHIECHI, 1999).

Nas pesquisas atuais, tem-se dado ênfase aos efeitos reprodutivos de diversas plantas, pois inúmeras possuem atividade estrogênica sendo que primeiramente foi demonstrada em 1926, e em meados da década de 70 já se tinha constatado que centenas de plantas exibiam atividade estrogênica. No entanto, os fitoestrógenos assumiriam importância biológica e econômica nos anos 40, com a diminuição da fertilidade em ovelhas induzida pela ingestão de trevos de pastagens, na Austrália, na chamada “Doença do Trevo” (MURKIES; WILCOX, 1998).

Esses efeitos fitoestrogênicos sobre reprodução podem ser indesejados, pois os princípios ativos das plantas podem atravessar a placenta, chegar ao feto e provocar malformações (PINTO, 2004). Anomalias e malformações do desenvolvimento embrionário ou fetal causam defeitos como deformidades, rupturas ou displasias (HANSEN; YANKOWITZ, 2002). Ao se falar em anomalias não significa apenas formação anormal dos tecidos, mas também anormalidades bioquímicas, que podem trazer sérios prejuízos à mãe e aos fetos, sendo que estas alterações podem ser causadas diretamente por um agente tóxico sobre o feto ou por meio de sua ação sobre o organismo materno (BERNARDI, 1999) Em virtude dos efeitos tóxicos sobre o organismo animal, já relatados em diversas plantas, constatou-se a necessidade do estudo da toxicologia reprodutiva, pois diversas plantas apresentaram atividades tóxicas sobre a reprodução.

3 CAPITULO 1

Estudo da toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Samanea tubulosa* na gestação de ratas Wistar

[Reproductive toxicity study of hydroalcoholic extract *Samanea tubulosa* in the Wistar rat gestation]

Paulo Alex Bezerra Sales¹, Janylla Mirck Guerra de Oliveira² Indira Régia e Silva², Tatiane Novaes da Costa², Melka Coelho Sá², Amilton Paulo Raposo Costa².

¹Universidade Federal do Piauí

1Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – UFPI

Campus Agrícola da Socopo

64049-550 – Teresina, PI

2Departamento de Morfofisiologia Veterinária – CCA/UFPI, Teresina, PI

RESUMO

A espécie *Samanea tubulosa* é utilizada no tratamento de infecções cutâneas, inflamações gástricas e infestações parasitárias, embora haja relato de atividade hemolítica pronunciada. Existem poucas informações quanto à toxicidade da *S. tubulosa*. O presente trabalho tem como objetivo avaliar possíveis efeitos do extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa* sobre ratas gestantes. Ratas Wistar prenhes (n=8) foram tratadas com a dose de 75mg/100g⁻¹ peso corporal de extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa* por via gástrica, enquanto o grupo controle (n=8) recebeu 1ml/100g⁻¹ pc de solução salina pela mesma via, por 19 dias. Procedeu-se à eutanásia dos animais ao 20º dia e as seguintes variáveis foram analisadas: peso corporal fetal, peso dos fetos e placentas, quantidade de corpos lúteos, pontos de reabsorção fetal, fetos vivos e mortos e número de implantações embrionárias. Não houve diferença estatística significativa em relação ao número de corpos lúteos e número de implantações, porém o grupo tratado apresentou menor peso fetal e presença de malformações fetais. O extrato de *S. tubulosa*, na dose estudada, apresentou toxicidade fetal causando malformações, perdas embrionárias pós-implante e diminuição pronunciada do peso da prole ao nascer.

Palavras-chave: *Samanea tubulosa*. Toxicidade. Problemas reprodutivos.

ABSTRACT

S. tubulosa is used to treat skin infections, gastric inflammations and parasitic infections, although there are reports of pronounced hemolytic activity. Here is little information available regarding the toxicity of *S. tubulosa*. This study aims to evaluate the possible effects of *S. tubulosa* hydroalcoholic extract on pregnant rats. Pregnant Wistar rats were treated with 75mg/100g⁻¹ body weight of hydroalcoholic extract from *S. tubulosa*, intragastrically, whereas the control group received 1ml/100g⁻¹ bw of saline by the same route for 19 days. The euthanasia of animals was carried out at day 20 and the following variables were analyzed: fetal body weight, weight of fetuses and placentas, the number of corpora lutea, fetal resorptions points, live and dead fetuses, and number of embryonic implantation. There was no statistically significant difference in the number of corpora lutea and number of implantations, but the treated group had lower fetal weight and presence of fetal malformations. The extract from *S. tubulosa*, at the dose studied, showed toxicity, causing fetal abnormalities, embryonic loss after implantation and pronounced decrease in the weight of offspring at birth.

Keywords: *Samanea tubulosa*. Toxicity. Reproductive problems

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o interesse da população pelas terapias naturais tem aumentado significativamente, inclusive nos países industrializados. Uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais em busca por alívio e cura de doenças talvez tenha sido pela ingestão de ervas (VIEGAS; BOLSANI e BARREIRO, 2006).

Dentre as plantas da flora brasileira, as leguminosas têm sido alvo de estudos por possuírem concentrações de flavonóides relativamente maiores que os outros tipos de plantas. A espécie *Samanea tubulosa*, o alvo de estudo deste trabalho é uma planta, da família Fabaceae (Leguminosae), conhecida popularmente como bordão-de-velho. Ela possui vagens

comestíveis e a polpa doce, com sabor de alcaçuz, sendo uma espécie nativa das Américas Tropicais e cultivada com propósitos ornamentais (LORENZ, 1995).

A *S. tubulosa* é encontrada em toda a bacia do Parnaíba, sendo suas vagens muito utilizadas na alimentação de ruminantes e bastante aceitas, pelo seu sabor adocicado e odor agradável. Quando adicionadas à alimentação de bovinos leiteiros, muitos produtores relatam que há um aumento na produção de leite e as vacas parecem aceitar melhor a ração (NASCIMENTO, 1996). É também considerada uma alternativa para suplementação alimentar de rebanhos em pastagens, por aumentar a eficiência da utilização dos nutrientes e melhorar o funcionamento ruminal (MILLIKEN, 1997; ALMEIDA, 2006).

Em estudos anteriores, *S. tubulosa* apresentou atividade antioxidante, que pode estar relacionada com a presença de compostos polifenólicos, como os flavonóides, que são capazes de proteger o organismo contra várias doenças crônicas (LIMA et al., 2009). Cruz (2006) descreveu seu uso na medicina popular para o tratamento de infecções cutâneas, inflamações gástricas e infestações parasitárias. Por outro lado, foi observado atividade hemolítica pronunciada (MILLIKEN, 1997; CRUZ, 2006).

A ascensão dos estudos toxicológicos sobre a reprodução se deve às constatações de efeitos ocasionados por plantas sobre o sistema reprodutor, onde várias pesquisas mostram seus potenciais tóxicos e terapêuticos. Sabe-se que a meta da pesquisa toxicológica é melhorar a habilidade de prever e avaliar o risco potencial do meio ambiente para a saúde humana (HOYER, 2001).

Ao contrário de aditivos químicos que são deliberadamente introduzidos na alimentação humana e animal, as substâncias tóxicas contidas nas plantas constituem um problema especial, já que sua eliminação não pode ser efetuada por uma ação legislativa.

A presença de flavonóides revela um possível potencial terapêutico na reposição hormonal e a presença de taninos dá a idéia de uma possível toxicidade, em especial, sobre o sistema reprodutor, o que merece ser investigado, dado o seu potencial uso terapêutico e na alimentação animal.

O conhecimento de que as vagens da *S. tubulosa* são usadas em fitoterapia humana, são consumidas por ruminantes em sistemas de criação extensivos, além de serem utilizadas na complementação alimentar de bovinos leiteiros e a falta de estudo toxicológico, especialmente referente à toxicidade reprodutiva, motivou esta pesquisa que tem por objetivo avaliar possíveis efeitos do extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa* sobre a gestação de ratas Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do extrato: o extrato hidroalcoólico das vagens foi preparado a partir vagens secas em estufa a $45 \pm 1^\circ \text{C}$, que foram posteriormente trituradas em moinho elétrico e submetidas à maceração com etanol a 70%, durante cinco dias à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. O extrato foi concentrado em rotavapor a 50°C , sendo então acondicionado em frascos de vidro âmbar e conservado na geladeira.

Animais: Foram utilizadas ratas Wistar adultas, pesando entre 180 – 250g, criadas e mantidas no Biotério de Experimentação do Departamento de Morfofisiologia Veterinária-CCA (Biotex). Os animais foram mantidos em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, em sala com ar condicionado e livre acesso a água e ração (NUVITAL). O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI, com parecer nº 033/09.

Dezesseis ratas adultas foram divididas, ao acaso, em dois grupos de oito: **Controle e Tratado**. Todas as ratas foram examinadas diariamente quanto à fase do ciclo estral, por meio de esfregaço vaginal a fresco. Aquelas detectadas em proestro foram acasaladas com um macho sabidamente fértil e a presença de espermatozóides no esfregaço da manhã seguinte ao acasalamento foi considerado indicativo de prenhez (1º dia). Uma vez prenhas, as ratas receberam os seguintes tratamentos:

Grupo controle: tratado com salina (veículo utilizado para diluir o extrato), via gástrica, na dose de 1 mL/100g de peso corporal, do 1º ao 19º dia de gestação.

Grupo tratado: extrato hidroalcoólico (75 mg/mL), na dose de 1mL/100g de peso corporal, via gástrica, do 1º ao 19º dia de gestação.

Eutanásia, exame e pesagem: Após o período de tratamento, no 21º dia de gestação, as ratas foram eutanasiadas com associação de ketamina (50mg) e xilazina (2%) intraperitoneal. O útero gravídico foi removido com seus conteúdos e, em seguida, foi realizada a contagem do número de fetos vivos e mortos, avaliado o peso fetal individual e da ninhada, o número de sítios de implantação e os pontos de reabsorção fetal. Também foi feita a pesagem das placentas de cada feto e contagem dos corpos lúteos nos ovários. Os fetos foram examinados macroscopicamente e com auxílio de um microscópio estereoscópico, quanto à presença de sinais vitais e de anomalias e malformações congênicas.

Os resultados foram analisados pelo teste “t” de Student, com nível de significância de 5% ($\alpha < 0,05$).

RESULTADOS

Os pesos dos fetos do grupo tratado foram significativamente inferiores aos do grupo controle (figura1).

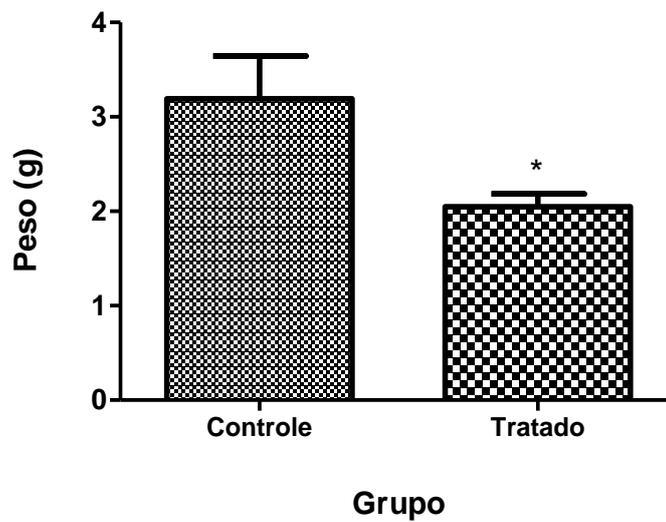
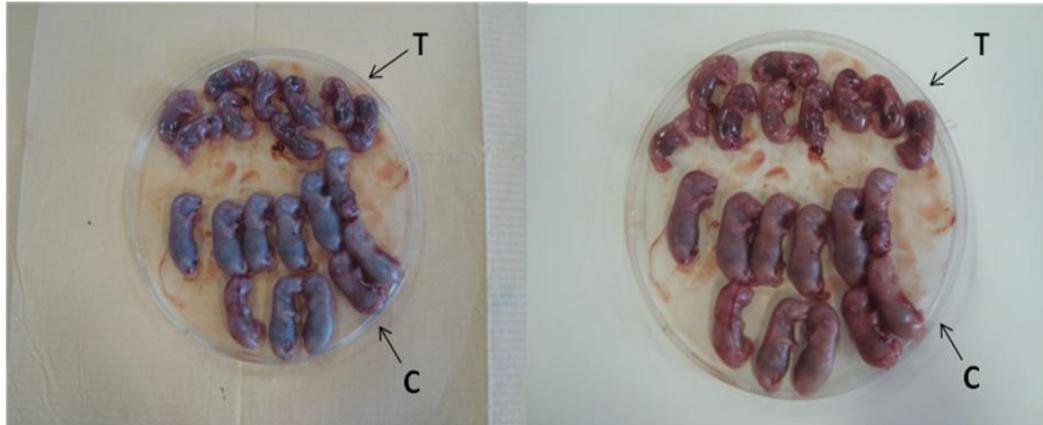


Figura 1. Pesos dos fetos de ratas submetidas aos tratamentos com solução salina e com extrato hidroalcoólico de *Samanea tubulosa*. *Diferença significativa em relação ao grupo-controle ($P < 0,05$).

Na avaliação macroscópica dos fetos, observa-se um aparente atraso no desenvolvimento fetal no grupo tratado (figuras 1A e 1B).



Figuras 2A e 2B: Fetos dos grupos controle (C) e tratado (T) evidenciando o menor tamanho dos fetos oriundos de ratas tratadas com extrato de *de Samanea tubulosa*. Fonte: Paulo Alex Bezerra Sales, 2010.

No grupo tratado com extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa*, foram observadas malformações fetais na morfologia externa. Na figura 2 não se verifica distinção entre as partes da face, havendo um aumento de tamanho na região do pescoço, que não se distingue precisamente da cabeça. Em alguns casos não houve desenvolvimento fetal adequado, observando-se malformações morfológicas externas generalizadas, também foram evidenciadas reabsorções fetais (figura 3).



Figura 3: Feto do grupo de ratas tratadas com extrato hidroalcoólico de *Samanea tubulosa* apresentando má formação de ordem morfológica, distinção imprecisa entre cabeça e pescoço. Fonte: Paulo Alex Bezerra Sales, 2010.



Figura 4: Presença de placentas sem feto, indicativas de reabsorções fetais no grupo tratado com *Samanea tubulosa*. Fonte: Paulo Alex Bezerra Sales, 2010.

A tabela 1 expressa a média e o E.P.M. dos pesos placentários onde não se observou diferença significativa entre os tratamentos. Não se evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto ao número de corpos lúteos e taxa de implantação (tabela 2). Também não foram encontradas diferenças significativas em relação ao número de fetos vivos, fetos mortos entre os grupos estudados (tabela 3).

Tabela 1. Peso placentário do grupo controle e tratado com extrato de *S. tubulosa*

Parâmetro	Controle	Tratado
Peso placentário (g)	0,6281 ± 0,02935	0,5427 ± 0,02713

Resultados expressos em média ± E.P.M.

Tabela 2. Número de corpos lúteos e implantações encontradas no grupo controle e tratado

Parâmetro	Controle	Tratado
Nº de Implantações	8,375 ± 0,5324	8,875 ± 0,8332
Nº de Corpos Lúteos	9,625 ± 0,5957	11,75 ± 1,161

Resultados expressos em média ± E.P.M. $p > 0,05$

Os cálculos das perdas embrionárias (nº de corpos lúteos – nº de implantações) evidenciaram que no grupo tratado houve um maior percentual de perdas, onde foram observados 25% de perdas no tratamento com extrato e 13% no grupo controle. Os dados também mostraram que houve maior perda pré-natal (nº corpos Lúteos – nº de fetos vivos) no grupo tratado (39,5%) quando comparado ao grupo controle que teve 18% de perdas.

Tabela 3. Número de fetos nascidos vivos e mortos do grupo controle e tratado

Parâmetro	Controle	Tratado
Nº Fetos vivo	7,875 ± 0,6105	7,125 ± 1,202
Nº Fetos mortos	0,2500 ± 0,2500	1,375 ± 0,5957

Resultados expressos em média ± E.P.M. $p > 0,05$

DISCUSSÃO

A eficiência reprodutiva é o fator econômico mais importante na produção animal, mas existem diversos fatores que afetam de forma negativa a reprodução, onde podemos citar as substâncias tóxicas presentes nas dietas dos animais como potenciais causadores de problemas reprodutivos, afetando diretamente o sucesso reprodutivo por levar a abortos,

interferência no ciclo estral, na ovogênese, espermatogênese, produzir malformações e outros problemas reprodutivos (JAMES et al., 1992).

O potencial forrageiro da *S. tubulosa* já foi descrito por Filho (2007) onde verificou-se que as vagens do *S. tubulosa* apresentavam 83% de matéria seca (MS) e, com base na MS, proteína bruta (PB) de 17,9%, fibra em detergente neutro (FDN) 25,2%, fibra em detergente ácido (FDA) 20,2%, carboidratos não fibrosos (CNF) 52% e energia bruta (EB) 34.3cal/g, tornando-se fundamental o seu estudo para o uso na alimentação animal.

Neste estudo, foi constatada a toxicidade dessa planta após administrar o extrato hidroalcoólico da vagem de *S. tubulosa*, que levou os animais a uma queda considerável no peso ao nascer e também ao aparecimento de malformações. Nascimento et al. (1996) cita em seu trabalho que existe um alcalóide tóxico nas sementes da *S. tubulosa*, mas que não constituiria um problema, pois as mesmas passariam inteiras pelo intestino do animal. No entanto, um relato de caso clínico de abortamento em uma vaca no município de Filadélfia em Tocantins (COSTA, 2009), teve como causa provável a ingestão de *S. tubulosa*, o que vem a corroborar com os achados deste experimento.

Estudos fitoquímicos confirmam a presença de alcalóides e revelam a presença de triterpenóides e compostos fenólicos como taninos, flavonóides e cumarinas em extrato de *S. tubulosa* (LIMA et al., 2009). Esses estudos mostram a presença de substâncias químicas distintas, onde destaca-se o tanino, pois o mesmo possui potencial tóxico, como sendo um fator antinutricional com habilidade de complexar e precipitar proteínas de soluções aquosas tornado-se tóxico (SALUNKHE et al., 1990). Embora essas características enfatizam a toxicidade do tanino, não é possível afirmar que ele seja o causador dos problemas sobre a reprodução encontrados nesse estudo.

A toxicidade causada pelo extrato de *S. tubulosa* em ratas prenhes deixa evidente seu poder tóxico aos animais e possivelmente a humanos, onde o cuidado com seu consumo tem que ser reavaliado, uma vez que o seu uso como fitoterápico foi registrado na literatura (CRUZ, 2006)

Em síntese, o extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa*, administrado a ratas Wistar, apresentou toxicidade para o feto, causando malformações, reabsorções fetais e diminuição pronunciada do peso ao nascer. Trata-se assim do primeiro relato experimental de toxicidade reprodutiva das vagens de *S. tubulosa*.

CONCLUSÕES

O extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa* apresenta toxicidade sobre a gestação de ratas. Com isso, seu uso na alimentação animal e na fitoterapia deve aguardar estudos mais detalhados quanto à dose tóxica, identificação dos princípios tóxicos e as formas de inativação desses princípios.

Apoio financeiro:

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Procad

UFPI – Universidade Federal do Piauí

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.C.S. Avaliação bromatológica de espécies arbóreas e arbustivas de pastagens em três municípios do Estado de Pernambuco. **Acta Sci. Anim. Sci.** v. 28, n. 1, p. 1-9, 2006.

COSTA, A.M.D. **Plantas tóxicas de interesse pecuário nas microrregiões de Araguaína e Bico do papagaio, norte do Tocantins**/Ana Maria Dantas Costa. -- Araguaína: [s. n], 2009.

CRUZ, R.B. **Caracterização Estrutural e Atividade Biológica de Constituintes Isolados de *Samanea tubulosa***. In: XXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural, UFRJ, 2006.

FILHO, M.A.M. et al. **Valor nutritivo da silagem de capim-elefante cv. roxo com adição de vagens de bordao-de-velho**. In: XVI Seminário de Iniciação Científica, 2007, Teresina. XVI Seminário de Iniciação Científica. teresina : EDUFPI, 2007.

HOYER, P. B. Reproductive toxicology: current and future directions. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 12, p. 1557–1564, 2001.

JAMES, L.F. et al. The effect of natural toxins on reproduction in livestock, **J.Anim. Sci.**, 1992, v.70, p. 1573-1579.

LIMA et al. **Potencial químico e biológico de Samanea tubulosa**. In: Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2009.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Editora Plantarum, São Paulo, 1995.

MILLIKEN, M. Plants for fever. Medicinal species in Latin America - a bibliographic study. **Balogh Scientific Books**, New York, 1997.

NASCIMENTO, M. P. S. C. B. et al. **FORAGEIRAS NATIVAS DA BACIA DO PARNAIBA: USOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA**. Teresina/Recife: EMBRAPA CPAMN/PNE, 1996, v.1, p.86.

SALUNKHE, D.K.; CHAVAN, J.K.; KADAM S.S. Dietary tannins: Consequences and remedies. **Boca Raton: CRC Press**, 1990, p.1-310.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, 2006.

4 CAPITULO 2

Estudo da atividade estrogênica e toxicidade sistêmica do extrato hidroalcoólico da *Samanea tubulosa* (benth.)

[Study of estrogenic activity and systemic toxicity of the hydroalcoholic extract of *Samanea tubulosa*]

Paulo Alex Bezerra Sales¹, Janylla Mirck Guerra de Oliveira², Indira Régia e Silva², Tatiane Novaes da Costa², Carla Edlane Bezerra Sales², Amilton Paulo Raposo Costa²

¹Universidade Federal do Piauí

1Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – UFPI

Campus Agrícola da Socopo

64049-550 – Teresina, PI

2Departamento de Morfofisiologia Veterinária – CCA/UFPI, Teresina, PI

RESUMO

A espécie *Samanea tubulosa*, conhecida popularmente como Bordão-de-Velho, tem sido amplamente utilizada, seja na fitoterapia humana, ou na alimentação animal. Seu fruto é muito consumido pelo gado bovino devido a sua palatabilidade e seus ramos também são forrageiras, com alto teor de proteína bruta. O objetivo deste trabalho foi avaliar possíveis efeitos do extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa* sobre a reprodução em ratas Wistar, pesquisando os seguintes parâmetros: atividade estrogênica e antiestrogênica, efeito sobre o ciclo estral e toxicidade sistêmica. No Protocolo 1, envolveu 4 grupos de ratas Wistar castradas (n=8 por grupo): grupo 1 (salina+ óleo de milho), grupo 2 (salina+estradiol), grupo 3 (extrato+ óleo) e grupo 4 (extrato + estradiol). Não foi evidenciado diferença estatística entre os grupos 1 e 3, nem entre os grupos 2 e 4, evidenciando falta de atividade estrogênica ou anti-estrogênica. Protocolo 2, envolveu dois grupos de ratas Wistar não castradas (n=9 por grupo). As ratas foram examinadas diariamente, entre 8:00 e 9:00 h durante 30 dias quanto à fase do ciclo estral e ao final desse período procedeu-se a coleta de sangue para dosagens bioquímicas e de órgãos internos para avaliação histopatológica. Não foi constatada atividade estrogênica, mas foram observados indícios de toxicidade sobre o útero. Houve o aumento da fosfatase alcalina provavelmente proveniente do tecido ósseo.

Palavras-chave: estrógeno. ciclo estral, útero

ABSTRACT

Samanea tubulosa, popularly known as Bordão-de-velho, has been widely used, whether in human phytotherapy or in animal feed. Its fruit are consumed by livestock due to its palatability and its branches are forage with high crude protein content. The objective of this work was to evaluate possible effects of *S. tubulosa* hidroalcoholic extract on reproduction in female wistar rats by searching the following parameters: estrogenic and antiestrogenic activity, effects on the estrous cycle and systemic toxicity. Protocol 1 involved four groups from castrated female rats (n=8 for group): Group 1 (saline + corn oil), Group 2 (saline + estradiol), Group 3 (extract + oil) and Group 4 (extract + estradiol). No difference was seen between groups 1 and 3, nor between groups 2 and 4, showing a lack of estrogenic or antiestrogenic activity. Protocol 2 involved two groups from no castrated female Wistar rats, (n=9 for group). The rats were examined daily between 8:00 and 9:00 h for 30 days to identify the stage of the estrous cycle and at the end of this period proceeded to collect blood for biochemical analyses and internal organs for histopathological evaluation. No estrogenic activity was detected, but signs of toxicity were observed on the uterus. There was an increase in alkaline phosphatase, probably from the bone tissue.

Keywords: Estrogen. Estrous cycle. Toxicology.

INTRODUÇÃO

A espécie *Samanea tubulosa* conhecida popularmente como Bordão-de-Velho, tem sido amplamente utilizada na alimentação animal. Seu fruto é muito procurado pelo gado bovino devido a sua palatabilidade, sendo que seus ramos também são forrageiras, com alto teor de proteína bruta (BERG, 1986; POTT, 1994). Em vários países faz-se uma farinha com os frutos, que é um alimento de alto valor nutritivo para as vacas, cabras e galinhas (LOPEZ et al., 1987).

O uso da *S.tubulosa* é amplo, sendo também citado na alimentação humana, que utiliza as vagens comestíveis, com polpa doce e sabor de alcaçuz, que podem ser usadas para produzir um aguardente, conhecido como “aguardente-de-saman”. Suas flores são melíferas,

com boa produção de néctar e o caule é adequado para produção de celulose, papel e lenha de boa qualidade (FERNADES, 2007).

Em seu estudo, Lima (2009) sugere a presença de compostos bioativos nessa espécie, após ter realizado o estudo fitoquímico da mesma, abrindo perspectivas para seu melhor aproveitamento.

Diversas plantas vêm sendo amplamente estudadas e usadas por exibirem atividade semelhante ao estrógeno. As propriedades estrogênicas e antiestrogênicas dos fitoestrógenos decorrem da interação destes com os receptores de estrogênios (Martim et al.,1978; Kondo et al.,1990).

Para que os estrógenos e fitoestrógenos exerçam suas funções hormonais é necessária a presença de receptores específicos, os receptores de estrógenos (Er), que começaram a ser caracterizados em meados da década de 70 por Jensen e Desombre (1973). Estes receptores pertencem à família de receptores nucleares (O'DONNELL et al.,2001) e até meados dos anos 90, acreditava-se que só existia um tipo de receptor de estrógeno (Er α), mas, posteriormente outro tipo de receptor foi encontrado (Er β), tendo sido evidenciados em humanos e ratos (KUIPER, 1996; TAYLOR and AL-AZZAWI, 2000)

Tecidos como útero e mama são alvos já bem conhecidos de Er α , mas sabemos que eles estão presentes em diversos outros tecidos como ósseo, cardiovascular e sistema nervoso central (COUSE and KORACH 1999).

As ações estrogênicas dos fitoestrogênios são extremamente fracas comparados ao estrógeno natural (MARKIEWICZ et al., 1993). Eles atuam fisiologicamente muito mais como antiestrogênios do que como estrogênios e seus efeitos parecem ser resultado de sua ligação ao receptor beta (KUIPER et al., 1998; PETERSEN et al., 1998).

Ao tempo em que uma planta pode apresentar atividade estrogênica ou antiestrogênica, a mesma pode ser tóxica aos homens e animais. Haraguchi (2003) define como planta tóxica todo o vegetal que, introduzido no organismo dos homens ou de animais, em condições naturais, é capaz de causar danos que se refletem na saúde e vitalidade desses seres, ocasionando um desequilíbrio que se traduz no paciente como sintomas de intoxicação.

Várias plantas são citadas como potenciais causadoras de sérios danos à reprodução animal, ocasionando diversas patologias ou perdas econômicas significativas ao produtor, dentre elas a falta de desenvolvimento da glândula mamária e agalaxia, liberação prematura do corioalantóide (placenta prévia), placenta aumentada de peso, engrossada e fibrosa, gestação prolongada, parto distócico ou dilatação e contrações diminuídas e aborto. Dentre

estas plantas podemos destacar a *Aspidosperma pyrifolium*, *Ateleia glazioviana* e *Tetrapteryx spp.*, *Claviceps purpúrea* (RIET-CORREA, 2007).

Vários estudos já relataram possíveis atividades estrogênicas e antiestrogênicas de diversas plantas, bem como à toxicidade sistêmica, mas nenhum delas faz referência à *S. tubulosa*. Devido a inexistência de informações, este trabalho tem como objetivo avaliar possíveis efeitos do extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa* sobre a reprodução em ratas Wistar, pesquisando os seguintes parâmetros: atividade estrogênica e antiestrogênica, efeito sobre o ciclo estral e toxicidade sistêmica.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do extrato: o extrato hidroalcoólico das vagens foi preparado a partir vagens secas em estufa a $45 \pm 1^\circ \text{C}$, que foram posteriormente trituradas em moinho elétrico e submetidas à maceração com etanol a 70%, durante cinco dias à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. O extrato foi concentrado em rotavapor a 50°C , sendo então acondicionado em frascos de vidro âmbar e conservado na geladeira.

Animais: Foram utilizadas ratas Wistar adultas castradas e não castradas, pesando entre 180 – 250 g, criadas e mantidas no Biotério de Experimentação do Departamento de Morfofisiologia Veterinária -CCA (Biotex). Os animais foram mantidos em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, em sala com ar condicionado e livre acesso a água e ração (NUVITAL) Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI, com parecer nº 033/09.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1: Atividade estrogênica e antiestrogênica

Ovariectomia: As ratas foram anestesiadas com ketamina (50mg) associada a xilazina (2%) na proporção de (2:1) 0,1ml /100 g de peso vivo e colocadas em decúbito lateral. De cada lado, na região do flanco foi feita uma incisão de 1,0 a 1,5 cm incidindo sobre a pele e tecido celular subcutâneo. Seguiu-se a abertura da cavidade peritoneal por divulsionamento das camadas musculares e peritônio. Através de cada incisão, localizou-se o ovário correspondente. Feita então uma ligadura na junção útero-tubárica, envolvendo toda a vascularização do ovário, e secção da tuba e demais estruturas entre a ligadura e o ovário, que

foi então removido. O corno uterino foi recolocado na cavidade abdominal e posteriormente feita a sutura da incisão em planos separados.

Para o material em teste foi montado um experimento, composto de quatro grupos, sendo: **Grupo 1 (controle negativo)** - tratado com salina via oral (1 mL/100 g de peso corporal) e óleo de milho via subcutânea (0,1 mL/100 g). **Grupo 2 (controle positivo)** - tratado com salina via oral e estradiol via subcutânea (1,0 µg/100 g). **Grupo 3 (extrato)** – tratado via oral com extrato hidroalcoólico da vagem de *S. tubulosa*, na concentração de 75 mg/mL, no volume de 1mL /100 g e óleo de milho via subcutânea (0,1 mL/100 g). **Grupo 4 (extrato + estradiol)** – tratado por via oral com extrato hidroalcoólico da vagem de *Samanea tubulosa*, na concentração de 75 mg/mL, na dose de 1 mL/100 g e estradiol via subcutânea (1,0 µg/100 g).

Cada grupo composto de oito ratas castradas e mantidas em repouso por um período de 30 dias, tempo necessário para os animais se recuperarem do trauma cirúrgico e para involução uterina. Após esse período, as ratas passaram pelos tratamentos que duraram quatro dias e no 5º dia, as ratas de todos os grupos foram examinadas por esfregaço vaginal e em seguida eutanasiadas, por excesso de anestésico (xilazina+ketamina), e os úteros removidos e pesados.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2: Avaliação do ciclo estral e toxicidade sistêmica

Utilizou-se 18 ratas Wistar, pesando entre 180-220g, sendo nove do grupo controle e nove do grupo experimental. Todas as ratas foram examinadas diariamente, entre 8:00 e 9:00 horas, por 30 dias quanto à fase do ciclo estral, durante o tratamento com o extrato em estudo. A secreção vaginal foi coletada com uma pipeta plástica contendo aproximadamente 100 µL de salina (NaCl a 0,9 %) e em seguida depositada sobre uma lâmina de vidro, para análise por meio de microscopia de luz, nas objetivas de 10 e 40x. O tratamento do grupo experimental constou de aplicação diária do extrato hidroalcoólico da vagem de *S. tubulosa*, por via gástrica, 1mL/100 g de peso corporal, na concentração de 75 mg/ mL, perfazendo dose de 750 mg/kg de peso corporal, durante 30 dias. O grupo controle recebeu, pelo mesmo período, solução salina na dose de 1mL/100 g de peso corporal. A duração do ciclo estral assim como de cada uma de suas fases foram utilizadas como parâmetros para análise.

Ao final do tratamento, as ratas foram anestesiadas conforme descrito anteriormente e procedeu-se a coleta de sangue por meio de punção cardíaca, em frascos sem anticoagulante, adicionados de ativador de coágulo (BD- Vacuette Z serum clot activator – BD-Indústria Cirúrgica LTDA – Juiz de Fora, MG), obtendo-se o soro, com o qual foram posteriormente avaliados os parâmetros bioquímicos. Em seguida os animais foram eutanaziadas por sobredose do mesmo anestésico utilizado para anestesia, para coleta e avaliação dos órgãos internos.

Avaliação dos parâmetros bioquímicos:

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 3500 rpm por cinco minutos e o soro separado. As determinações bioquímicas foram realizadas por química seca (Reflotron, Roche Diagnostics, Brasil). Foram avaliados os seguintes parâmetros séricos: fosfatase alcalina, TGO, TGP e uréia.

Análise histopatológica:

Após eutanásia, foi feita a remoção e pesagem do coração, fígado, baço, rins, ovários e útero. Secções desses órgãos foram fixadas em formalina (solução de formol a 10%) tamponada e, após 24 horas, fragmentos menores foram submetidos ao processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos de rotina (BACHA; WOOD, 1990). Os fragmentos tissulares foram seccionados em fatias com espessura de 3,0 μM e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio de luz.

Os resultados de peso uterino do protocolo 1 foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os resultados do protocolo 2 foram analisados pelo teste t de Student ($\alpha < 0,05$).

RESULTADOS

Os resultados do peso uterino em mg (média \pm EPM) foram respectivamente: G1=92,2 \pm 25,2; G2=711,7 \pm 49,4; G3=98,9 \pm 29,6; G4=562,5 \pm 95,7. Houve diferença significativa entre o G1 e G2, assim como entre G1 e G4, mostrando a eficácia do tratamento com estradiol em G2 e G4. No entanto, não houve diferença significativa entre G2 e G4, mostrando que o

extrato não alterou o efeito do estradiol sobre o útero, demonstrando falta de atividade anti-estrogênica. Também não houve diferença entre G1 e G3, mostrando que o extrato não alterou significativamente o peso do útero hipotrofiado pela castração, mostrando ausência de atividade estrogênica.

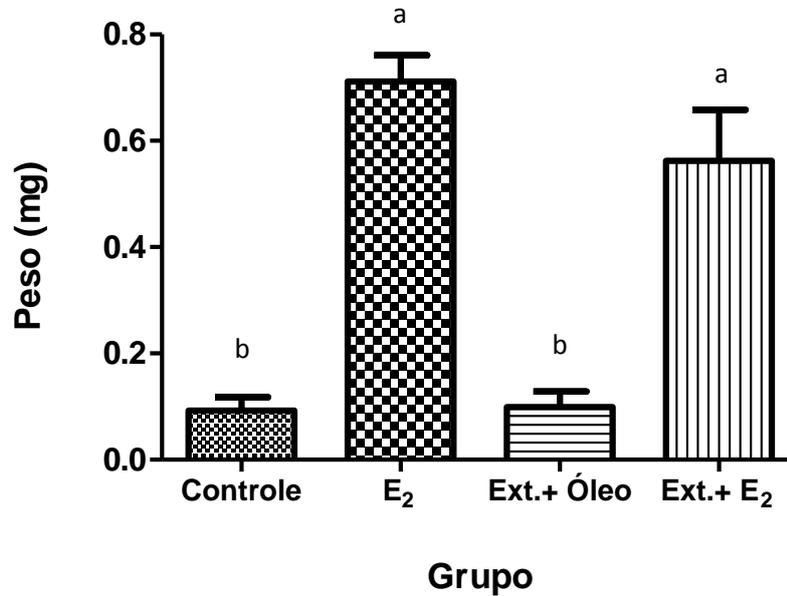


Figura 1. Peso do útero de ratas ovariectomizadas submetidas aos tratamentos com salina (Con), estradiol (E₂), extrato de *Samanea tubulosa* (Ext) e extrato de *S. tubulosa* + estradiol (Ext+E₂).

Neste experimento não se constatou diferenças no número de repetições de cada fase do ciclo estral entre o grupo salina e o tratado com extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa*, mostrando que o extrato não interfere no o ciclo estral.

A tabela 1 mostra parâmetros bioquímicos, onde se observou a concentração de fosfatase alcalina significativamente superior no grupo tratado em relação ao grupo controle. Os resultados dos níveis séricos de TGO, TGP, uréia e Creatinina não diferiram significativamente entre grupos, o que confirma o resultado histopatológico, onde não se constatou alterações morfológicas hepáticas ou renais nos grupos estudados.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos de ratas tratadas com solução salina (controle) e extrato de *S. tubulosa* na dose de 75mg/100g durante 30 dias

Parâmetros Bioquímicos	Controle	Extrato
Fosfatase Alcalina	239,00 ± 40,25	495,90 ± 95,03*
TGO	266,10 ± 36,54	187,20 ± 18,01
TGP	80,29 ± 10,22	74,49 ± 8,413
Uréia	40,05 ± 1,56	109,30 ± 33,76
Creatinina	0,51 ± 0,08	0,55 ± 0,05

(valores médios ± EPM)*Diferença significativa em relação ao grupo-controle (P<0,05)

No exame histopatológico do útero, constatou-se que todos os animais avaliados do grupo tratado apresentavam infiltrado inflamatório eosinofílico, e em alguns, havia degeneração de moderada a severa do epitélio endometrial, evidenciando efeito tóxico da *S. tubulosa* sobre o útero.

O peso do ovário também se encontrava aumentado no grupo tratado, sendo que no exame histopatológico não foi constatado nenhum tipo de alteração proliferativa, inflamatória ou outro tipo de alteração do tecido ovariano.

Tabela 2. Peso dos órgãos avaliados: coração, fígado, baço, rins, ovários e útero em ratas submetidas aos tratamentos com salina e extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa*

Órgãos	Peso dos órgãos (gramas)	
	Controle	Extrato
Coração	0,70 ± 0,05	0,76 ± 0,04
Fígado	6,34 ± 0,03	6,73 ± 0,43
Baço	0,69 ± 0,05	0,67 ± 0,03
Rins	1,47 ± 0,06	1,70 ± 0,07
Ovários	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,02*
Útero	0,50 ± 0,13	0,55 ± 0,07

(valores médios ± EPM)*Diferença significativa em relação ao grupo controle (P<0,05).

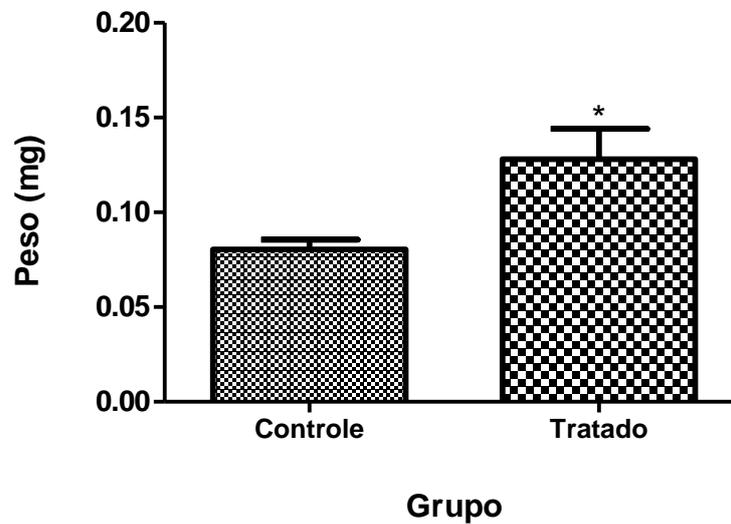


Figura 2. Peso de ovários de ratas submetidas aos tratamentos com solução salina (controle) e extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa* (tratado). *Diferença significativa em relação ao grupo-controle ($P < 0,05$).

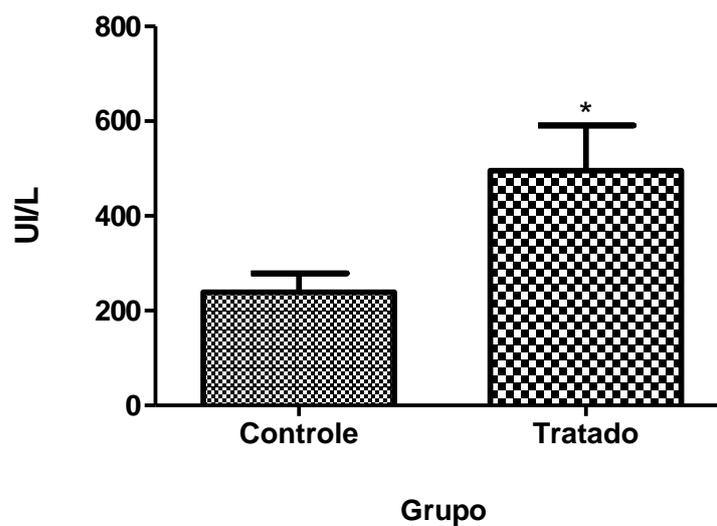


Figura 3. Níveis plasmáticos de fosfatase alcalina de ratas submetidas aos tratamentos com salina (controle) e extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa* (tratado)

*Diferença significativa em relação ao grupo-controle (P<0,05).

DISCUSSÃO

Vários estudos mostram a eficiência da reposição hormonal que é feita devido a uma acentuada diminuição estrogênica em determinadas fases da vida da mulher ou quando da necessidade advinda de problemas reprodutivos tanto em mulheres como em fêmeas domésticas. Uma das alternativas de reposição atualmente estudada é realizada através do uso de fitoestrógenos, com o objetivo de diminuir o déficit hormonal e os sérios problemas que advêm da falta do estrógeno no organismo e dos efeitos deletérios que a reposição hormonal feita por administração de estradiol pode vir a ocasionar ao organismo. Por esse motivo, há uma busca permanente de fontes naturais de substâncias com atividade estrogênica que possam suprir o déficit da menopausa sem os efeitos indesejáveis da reposição com estrógenos sintéticos. Neste experimento foi pesquisou-se possível atividade estrogênica e anti-estrogênica no extrato de *S.Tubulosa*, assim como efeitos sobre o ciclo estral e toxicidade sobre diversos órgãos não reprodutivos.

O ciclo estral é o ciclo reprodutivo das fêmeas mamíferas, onde se caracterizam quatro fases distintas: proestro, estro, diestro I ou metaestro e diestro I. A duração média do ciclo estral é de quatro dias para ratas (FREEMAN, 1988), e devido a esse curto período, tem-se o rato como o animal ideal para o estudo das variações desse ciclo (MARCONDES et al., 2001). O extrato de *S.Tubulosa* não produziu qualquer alteração no ciclo estral das ratas, mostrando-se, neste aspecto, seguro quanto ao seu uso medicamentoso ou alimentar.

Vários órgãos e tecidos produzem fosfatase alcalina, entre eles o fígado, ossos, rins, intestino, pulmão, placenta, leite vascular, neutrófilos e linfócitos T ativados (PACE, 1999; TOLAYMAN, 2000). As alterações nas concentrações da bilirrubina e fosfatase alcalina estão diretamente relacionadas à obstrução biliar e /ou lesão hepatocelular. A bilirrubina total e frações, bem como a fosfatase alcalina são predominantemente indicadoras de colestase (LIMA, 2010). Segundo MINCIS (2007), o aumento sérico dos níveis de fosfatase alcalina se relaciona predominantemente com distúrbios ósseos e hepáticos, uma vez que os parâmetros mais específicos de função hepática, TGO e TGP, não foram alterados, o mais provável é que esta fosfatase alcalina seja de origem óssea.

Embora a fosfatase alcalina seja um indicador de colestase (REICHILING; KAPLAN,

1998), não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, quanto ao peso do fígado e rins dos animais estudados. No exame histopatológico, observou-se que o tecido hepático e renal de ambos os grupos encontrava-se sem qualquer anomalia, e por isso a causa intra-hepática e renal pode ser desconsiderada. Além disso, uma colestase provocaria icterícia generalizada e isso não foi observado na necropsia. Assim sendo, origem mais provável do aumento de fosfatase alcalina sérica é mesmo óssea, o que demandará futuras pesquisas para constatar tais alterações por meio de avaliações específicas desse tecido, como a calcemia e os indicadores de formação e destruição óssea (MARTINS, 2006).

A degeneração do epitélio do endométrio, com aparecimento de polimorfos nucleares pode levar a uma aberração funcional do tecido uterino interferindo com o processo de nidação (MOGHISSI; REAME, 1976). Assim, as alterações morfológicas caracterizadas nas ratas tratadas com extrato hidroalcoólico de *S. tubulosa* podem retardar os movimentos dos ovócitos e dos espermatozóides, uma vez que a abundância de cílios no epitélio uterino de revestimento funciona como uma ferramenta útil para o transporte dos gametas. Para uma adequada receptividade é necessário a integridade endometrial, que influencia a taxa de implantação. No período de implantação ocorrem transformações nas células endometriais típicas, que são mensuradas pela espessura endometrial, e se fazem necessárias para uma implantação bem-sucedida (HERNANDEZ, 2006; LIU, 2008; BOURGAIN et al., 2003).

Foi observado que a média de peso dos ovários das ratas tratadas com extrato mais elevada que a do grupo controle. O peso dos ovários aumenta normalmente na fase folicular e na presença de corpos lúteos, especialmente quando aumenta a quantidade de folículos grandes ou corpos lúteos produto dessas ovulações. No entanto, não se tem evidência de maior incidência de estros nos animais tratados com extrato. A única explicação plausível, diante do fato de que não foi avaliado o número de folículos e ovulações, é que no dia da eutanásia e avaliação dos ovários dos oito animais do grupo tratado com extrato, no dia da eutanásia, duas estavam em DII, três no estro e três no proestro. Já as ratas do controle estavam três no DII, três DI e duas no proestro sendo conhecido que o peso do ovário atinge o máximo imediatamente antes da ovulação, que nas ratas acontece na manhã do estro com um número de 10 a 14 ovócitos a cada ciclo (GOMES et al., 1999). Assim, o grupo tratado tinha daquele dia maior número de animais em fase do ciclo em que os ovários atingem maior peso.

Em resumo, não foi constatado com clareza no grupo tratado com extrato de *S. Tubulosa* a falta de atividade estrogênica e antiestrogênica, que não interferiu no ciclo estral, mas foi observado indício de toxicidade sobre o útero. Houve provavelmente alteração

óssea, sinalizada pelo aumento da fosfatase alcalina sérica, que precisa ser confirmada em futuras pesquisas com metodologias apropriadas.

Conclusão

O extrato de *S. tubulosa* apresentou toxicidade, que precisa ser investigada em detalhes e enquanto isso, seu uso na terapêutica e alimentação humana e animal não são recomendados.

Suporte financeiro:

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Procad
UFPI – Universidade Federal do Piauí pelos incentivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO LIMA, A. A. L. de et al . Estudo da fosfatase alcalina em ratos cirróticos hepatectomizados após aplicação de laser. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, 2010 .

BERG, M. E. VAN DEN. Formas atuais e potenciais de aproveitamento das espécies nativas e exóticas do Pantanal Mato-Grossense. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do pantanal, 1., 1984, Corumbá. Anais... Brasília, DF: EMBRAPA-DDT; Corumbá: EMBRAPACAP, 1986. p. 131-136. (EMBRAPA-CPAP. Documentos, 5).

BOURGAIN, C.; DEVROEY, P. The endometrium in stimulated cycles for IVF. **Hum Reprod Update**, v.9, p.51-522, 2003.

CARVALHO, P.E.R. Embrapa Florestas. Circular técnica 132. Colombo-PR, Novembro, 2007.

COUSE, J.F.; KORACH, K.S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? **Endocr. Rev.** v.20, p.358–417, 1999.

FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. In: E. Knobil, J. Neil (eds.), **Physiology of reproduction**. Raven Press Ltd., New York, p. 1893-1928, 1988.

GOMES, C.M.; FRANTZ, P. J.; SANVITTO, G. L.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; LUCION, A. B. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. **Brazilian journal of medical and biological research**. v.32, p.1239-1242, 1999.

HARAGUCHI, M. Plantas tóxicas de interesse na Pecuária. **Biológico**. v.65, p.37 – 39, 2003.

JESSEN, E.V.; DESOMBRE, E. R. Estrogen-receptor interaction. **Science**, v.182, p.126-134.

KONDO, H. et al. Substances, new specific estrogen-receptor binding inhibitors. Production, isolation, structure determination and biological properties. **J. Antibio.**, v. 43, p.1533-1542, 1990.

KUIPER, G.G. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p.5925-5930, 1996.

KUIPER, G. et al. Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. **Endocrinology**, v.139, p. 874–883, 1998.

LIMA et al. Potencial químico e biológico de *Samanea tubulosa*. In: Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2009.

LOPEZ, J. A.; LITTLE, E. L., Jr.; RITZ, G. F.; ROMBOLD, J. S.; HAHN, W. J. Arboles comunes del Paraguay: ñande yvyra mata kuera. Washington: Cuerpo de Paz, 1987. 425 p.

MARKIEWICZ, L.; GAREY, J.; ADLERCREUTZ, H; GURPIDE, E. In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v.45, 1993.

MARTIN, P.M. et al. Phytoestrogen interaction with estrogen receptor in human breast cancer cells. **Endocrinology**, v.103, p.1860-1867, 1978.

MARCONDES, F. K.; MIGUEL, K.; MELO, L. L.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. **Physiol. Behav.**, v.74, p.435-440, 2001.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Enzimas importantes: Por que são importantes para o estudo de doenças do fígado. **Prática hospitalar**. Ano IX, Nº 51, Maio-Junho/2007.

O'DONNELL, L. et al., Estrogen and spermatogenesis. **Endocr.Rev.**, v. 22, p.289-318.

PACE, A.E.; OSINDE, M.E.. Hiperfosfatemia transitória benigna de la infância. Uma aproximación diagnóstica racional. **Arch. Argent. Pediatr.**, v.97, p.383-90. 1999.

POTT, A.; POTT, V. J. Plantas do Pantanal. Brasília, DF: EMBRAPA–SPI; Corumbá: EMBRAPA-CPAP;. p.320, 1994.

RAIB, escrita com base em: RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.C. Plantas tóxicas e micotoxinas. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R. (Eds.). Doenças de ruminantes e equinos. 3.ed.Santa Maria: Palocci,2007.

REICHILING, J.J. ; KAPLAN, M.M. Clinical use of serum enzymes in liver disease. **Dig Dis Sci**, v. 33, p.1601-1614, 1988.

TAYLOR, A. H.; AL-AZZAWI F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues.**Journal of Molecular Endocrinology**, v. 24, p.145–155, 2000.

TOLAYMAT , N.; MELO, M. C. Benign transient hyperphosphatasemia of infancy and childhood. **South Med J.**, v. 93, p.162-4, 2000.

MOGHISSI, K.S.; REAME, N.E. Effects of progestational agents on the female reproductive tract. Proceedings of the workshop on the SEM in Reproductive Biology IIT Research Institute Chicago. Scanning Electron Microscopy Part VI 1976, p. 373– 8.

FADEL H.E., DENNIS B.S., LOURENS J.D., et al. The human uterotubal junction: a scanning electron microscope study during different phases of the menstrual cycle. **Fertil. Steril.**, v.27, p.1176–86, 1976.

HERNANDEZ, A. S.; SANTOS, H. R.; GALACHE, V. P. et al. Endometrial receptivity: numerical classification to successful prognosis in assisted reproduction programs. **Gynecol. Obstet. Mex.**, v.74, p.13, 2006.

LIU, Y.; HUANG, G.; YANG, M. Study of Endometrial Receptivity during Implantation in Implantation Dysfunction Mouse. **Journal of Reproduction & Contraception**, v.19, p.27-34 2008.

MARTINS, A.S. et al. Fosfatase alcalina óssea,2006.

http://www.wgate.com.br/conteudo/medicinaesaudefisioterapia/reumato/fosfatase_2006_universo/fosfatase_2006_universo.htmFOSFATASE ALCALINA ÓSSEA>. Acessado em: 11 de Nov. de 2010.

VANONI, A.P.N.B. Dissertação:Avaliação fitoestrogênica do extrato hidroalcoólico e da infusão das folhas de *Morus nigra* .Porto Alegre, 2006.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do protocolo experimental empregado neste estudo, foi possível concluir que:

A *S. tubulosa* apresenta toxicidade sobre a gestação levando a malformações, atraso do desenvolvimento fetal e o aparecimento de reabsorções fetais

Há um aumento do nível de fosfatase alcalina que se suspeita ser de origem óssea, sendo necessária a realização de estudos mais aprofundados para a sua confirmação.

Existiu um período mais prolongado para se obter um produto, acarretando numa ninhada de menor tamanho e com aparecimentos de toxicidade fetal.

Apesar do alto valor nutritivo e do uso já evidenciado da mesma na alimentação animal, não é aconselhável o uso da *S. tubulosa* por conta da evidente toxicidade sobre a gestação.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

- ALEXANDROVA, R. et al. Phytoproducts and cancer. **Experimental Pathology and Parasitology**. v. 4, p. 15-26, 2000.
- BENT, S.; KO, R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. **The American Journal of Medicine**. v.116, p.478-485, 2004.
- BERNARDI, M.M. **Exposição aos medicamentos durante o período perinatal**. In: SPINOSA, H.S.; GORNIAC, S.L. BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada a medicina veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.p.566-574,1999.
- CARVALHO, P.E.R. Embrapa Florestas. **Circular técnica 132**. Colombo-PR, Novembro, 2007.
- CHIECHI, L.M. et al. Fitoestrogeni alimentari e prevenzione dell'osteoporosi e della malattia cardiovascolare postmenopausale. **Minerva Ginecol**. v. 51,p. 343-358, 1999.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Invest**, v.17, p.153-163, 1999.
- GESLER,W.M. Therapeutic landscapes: medical issues in light of the new cultural geography. **Social Science and Medicine**. v.34,p.735-736,1992.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN K. Bioactivity in plants: between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p.3864-3874, 1991.
- HANSEN, W.F.; YANKIWITZ, J. Pharmacologic therapy for medical discords during pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.45,n.1, p.136-152,2002.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Editora Plantarum,Odessa, p.201, 2002.
- MACHADO, A. **Avaliação da produção de literia e de vagens de três leguminosas arbóreas nativas do Nordeste**. Recife, 2005.p.75. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.
- MORRIS, C.A.; AVORN, J. Internet marketing of herbal products. **JAMA**. v.290, p.1505–1509, 2003.
- MURKIES, A.L.; WILCOX, G.; DAVIS, S.R. Clinical review 92: Phytoestrogens. **J. Clin. Endocrinol. Metab**. v. 83, p. 297-303,1998.
- OLIVEIRA, L.N. et al. **Composição químico-bromatológica de vagens de leguminosas arbóreas do semi-árido**1.18 a 22 de maio de 2009. Águas de Lindóia/SP.FZEA/USP-ABZ

PINTO, V.M. Dissertação:**Avaliação toxicológica da preparação fitoterápica contendo *Piper methysticum* Fost, Piperaceae sobre o desenvolvimento pré-natal em ratas Wistar.**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.Porto Alegre

SIMONS, R.G.; GRINWICH D.L. Immunoreactive detection of four mammalian steroids in plants. **Can. J. Bot.**, v.67, p.288-296,1989.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, 2006.

ANEXO

Anexo A – Instruções aos autores do periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* (ISSN 0102-0935 versão impressa), segundo os quais foram formatados e submetidos para publicação os artigos dos dois capítulos desta dissertação.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

O periódico *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* é editado pela Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia/FEPMVZ-Editora, CNPJ: 6.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins relacionadas com a produção animal. Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). A lista de especialistas que colaboraram em cada volume é publicada no último fascículo do ano. Os trabalhos cujos textos necessitem de revisões ou correções que não puderem ser feitas pelos editores serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista. Os trabalhos para publicação deverão ser encaminhados ao FEP MVZ Editora Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Caixa Postal 567 30123-970 - Belo Horizonte, MG Telefone: 0055 21 31 499 2041, Fax: 0055 21 31 499 2042 e-mail: revista@vet.ufmg.br.

NORMAS GERAIS

O *Brazilian Journal of Animal Science* publica os seguintes tipos de manuscritos:

Original trabalho de pesquisa. Este é um relato completo de um estudo experimental. Ele é baseado na premissa de que os resultados são a consequência da investigação. Elementos do corpo principal do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusão, Abstract devem ser fornecidos em Inglês e Português.

Relato de caso. Refere-se especialmente às áreas médica na qual um relatório imediato é mais importante do que um tratamento completo do assunto, ou publicações em que os resultados não são planejados. Elementos do texto: Introdução, Descrição do Caso, Discussão e Conclusões (quando aplicado). Se o texto está em Português, um resumo em Inglês deve ser fornecido e vice-versa.

Comunicação Breve. Este é um relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental dignos de publicação, embora insuficientes ou muito inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc) também se encaixam aqui. Deve ser conciso, com um máximo de quatro páginas impressas, sem as rubricas distintas de documentos formais, mas seguindo a mesma ordem.

Os trabalhos deverão ser redigidos em Inglês ou Português.

Para a ortografia Inglês usar o Webster's Third New International Dictionary.

Formatar texto e arquivos (. Doc) O arquivo eletrônico deve ser formatado para o Microsoft Word, todas as páginas A4, com margens de 3 cm, fonte Times New Roman 12, continuamente e sem formatação, o espaço entre linhas 1,5, linhas e páginas numeradas. Não exceder 15 páginas.

Manuscrito Seções

Título. Em ambas as línguas, Inglês e Português. Não exceda 100 caracteres.

Os nomes dos autores. Devem ser listados abaixo do título. Siga cada nome com expoentes em algarismos arábicos para indicar filiações. Filiações devem ser listados abaixo dos nomes dos autores e em ordem numérica. O autor correspondente deve ser indicado junto com endereço completo, telefone e número de fax e e-mail

Abstract e Resumo. Cada um com um máximo de 200 palavras. Estando claramente a finalidade do trabalho, indicar os métodos utilizados e resumir as conclusões.

Palavras-chave e Palavras-chave. Máximo de cinco palavras-chave.

Introdução: Esta seção deve fornecer informações que levaram à hipótese testada. A seção deve terminar com uma breve declaração dos objectivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve incluir o desenho do estudo, tipo de materiais envolvidos, o número de animais por grupo, uma descrição clara de todos os métodos utilizados e / ou referências claras aos métodos publicados, e o tipo de análise utilizado. Não use legendas. A aprovação do Comitê de Bioética e Biossegurança é necessária quando os animais e organismos geneticamente modificados estão envolvidos.

Resultados: Forma clara e objetiva dos principais resultados encontrados.

Discussão: A discussão deve estar focada nos resultados encontrados.

Obs.: Seções Resultados e Discussão podem ser combinados.

Conclusões: Recomenda-se que as principais conclusões sustentadas pelos dados da investigação sejam indicadas.

Ilustrações: Tabelas e figuras: Qualquer ilustração anteriormente publicada deve conter abaixo da legenda de origem (identificação do autor e data), com a informação correspondente deve figurar na lista de referências.

Tabelas: dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas de definir uma tabela. Apenas linhas horizontais na separação do cabeçalho e final de uma tabela. A legenda da tabela, na parte superior, deve receber, inicialmente, a palavra Tabela, seguida pelo seu número em algarismos arábicos e referidas no texto como Tabela.

Figura: As ilustrações que contém desenhos, fotografias, gráficos, esquemas, fluxogramas, etc Deverão ser enviados em arquivo separado com extensão jpg. Os títulos das figuras devem ser apresentados começando com número árabe, e então o título completo. No texto, refere-se aos números na ordem numérica em que estão listados, ou seja, Fig. 1, fig. 2, Fig. 1-2, etc

Agradecimentos: Devem ser resumidos.

Referências

As referências devem ser listadas em ordem alfabética.

Citações

As citações devem ser em conformidade com a ABNT / NBR 10520 de 2002. No texto, a referência é citado entre parênteses para evitar a interrupção na leitura do texto da seguinte forma:

- * Um autor: (Silva, 1971) ou Silva (1971)
- * Dois autores: (Lopes, Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- * Mais de dois autores: (Ferguson et al, 1979.) Ou Ferguson et al. (1979)
- * Mais do que um trabalho citado: Dunne (1967), Silva (1971) e Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971;Ferguson et al, 1979), sempre seguindo uma ordem cronológica.

Citação de citação: Dentro do texto deve ser citado o autor e a data do documento original seguido e citado por ano do trabalho consultado. Só o trabalho consultado deve aparecer na lista de referência.

Comunicação pessoal: referências a respeito de "comunicações pessoais" não devem ser citados na lista de referência, mas devem ser mencionadas no texto. Após as informações, deve ser citado autor, ano, a Instituição, e da expressão "comunicação pessoal".

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-1988.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Books and monograph

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C. F. A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Electronic documents

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related_Articles/>. Acessado em: 5 dez. 1994