

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Thaisa Borim Pickler

ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA À *Caesalpinia ferrea*

Sorocaba/SP

2015

Thaisa Borim Pickler

ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA À *Caesalpinia ferrea*

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Gerenutti

Sorocaba/SP

2015

Thaís Borim Pickler

ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA À *Caesalpinia ferrea*

**Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade de Sorocaba.**

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

**Profa. Dra. Marli Gerenutti
Universidade de Sorocaba**

**Profa. Dra. Angela Faustino Jozala
Universidade de Sorocaba**

**Profa. Dra. Raquel de Mendonça Rosa Castro
Universidade de Sorocaba**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido e eternamente amado avô, professor Antônio Carlos Ignacio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, sem suas bênçãos e proteção nada seria possível.

À minha orientadora, professora Marli Gerenutti, pelo incentivo, confiança, acolhimento e apoio. Obrigada por ser essa excelente e humana profissional em que pude me espelhar desde a época da graduação.

À professora Denise Grotto, pela gentileza da colaboração e apoio durante a realização do trabalho e por tornar tudo mais leve e colorido.

Às colegas de trabalho, Giovana Sabadim, Karina Piatto Lopes e Natalya Abduch, agradeço pela colaboração na execução da parte experimental e por dividirem comigo as angústias e desafios da vida de pesquisadora.

Às minhas pequenas, Marina e Melissa, por serem a minha fonte inesgotável de estímulo.

Em especial, com o coração repleto de amor e de saudades, ao meu avô Toninho, sem ele nada disso seria possível. Avozinho, você sempre foi e será meu grande incentivador. Impossível conseguir retribuir tudo que fez por mim e pela minha família. Tenho muito orgulho de ser sua neta. Obrigada por sempre acreditar em mim e em meus sonhos!

Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.

(Roberto Shinyashiki)

RESUMO

A espécie *Caesalpinia ferrea* cresce em todo o Brasil, sendo largamente utilizada nas regiões Norte e Nordeste no tratamento de tosse crônica, asma, ulcera gastroduodenal e tuberculose. Tradicionalmente é sugerida no tratamento sintomático de lesões cutâneas e de mucosas, assim como no tratamento de glicosúria. O objetivo do trabalho foi realizar ensaios pré-clínicos da exposição materna à *Caesalpinia ferrea* a fim de estudar os efeitos dos extratos hidroalcoólicos secos reconstituídos de cascas e sementes da *Caesalpinia ferrea* na evolução da gestação de ratas. Para isso, as ratas prenhes foram expostas, durante todo o período de gestação, às doses de 1,0 g/kg/dia (por via oral) aos extratos hidroalcoólicos secos reconstituídos da casca do lenho (GCas), das sementes (GSem), e o grupo controle recebeu solução salina (0,9%) - GC. Para a avaliação de toxicidade pré-clínica foram utilizadas análises bioquímicas de alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST, creatinina, ureia, cálcio, glicose, triglicérides, colesterol total, lipoproteínas de alta densidade - HDL; índices hematimétricos; dosagens de glutathiona reduzida - GSH, catalase e glutathiona peroxidase - GPx; e análises de capacidade reprodutiva. Os resultados da avaliação materna indicaram que não houve alterações na capacidade reprodutiva, entretanto houve aumento dos níveis de creatinina ($F=3,996$, $p<0,05$) e uma redução plaquetária ($F=15,141$, $p<0,01$) no GSem, indicando uma provável toxicidade materna. A toxicidade fetal foi demonstrada através de alterações encontradas no líquido amniótico e na placenta dos fetos. A análise do líquido amniótico indicou um aumento de AST no GSem ($F=3,93$, $p<0,05$), aumento nos níveis de glicose em GCas e GSem ($F=11,26$, $p<0,01$), além de redução dos níveis de cálcio no GSem ($F=6,095$, $p<0,05$). A análise de placentas indicou um aumento dos níveis de triglicérides no GCas ($F=5,032$, $p<0,005$). Estes dados, tomados em conjunto, sugerem que o extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de *Caesalpinia ferrea* não é seguro quando administrado durante o período de gestação de ratas.

Palavras-chave: *Caesalpinia ferrea*. Dosagens bioquímicas. Estresse oxidativo. Toxicologia da reprodução. Ensaio *in vivo*.

ABSTRACT

The *Caesalpinia ferrea* species grows in Brazil and is widely used in the North and Northeast in the treatment of chronic cough, asthma, gastroduodenal ulcer and tuberculosis. Traditionally it has been suggested in the symptomatic treatment of skin and mucosal lesions, as well as in the treatment of glycosuria. The objective was to conduct pre-clinical trials of maternal exposure to *Caesalpinia ferrea* to study the effects of the dry hydroalcoholic extracts reconstituted skins and seeds of *Caesalpinia ferrea* the course of pregnancy in female rats. For this, female rats were exposed during the entire period of gestation at the doses of 1.0 g/kg/day (orally) to the reconstituted dried hydroalcoholic extracts of the bark of the log (GCas), seeds (GSem) and the control group received saline (0.9%) - GC. For the evaluation of preclinical toxicity were used for biochemical analyzes alanine aminotransferase - ALT, aspartate aminotransferase - AST, creatinine, urea, calcium, glucose, triglycerides, total cholesterol, high density lipoproteins - HDL; RBC indices; dosages of reduced glutathione - GSH, catalase and glutathione peroxidase - GPx; and analysis of reproductive capacity. The results of evaluation mother showed no changes in reproductive capacity, however, there was an increase in creatinine levels ($F=3.996$, $p<0.05$) and a platelet decrease ($F=15.141$, $p<0.01$) GSem, indicating a probable maternal toxicity. Fetal toxicity was demonstrated by changes found in amniotic fluid and placenta of the fetus. The analysis of the amniotic fluid indicated an increase of AST GSem ($F=3.93$, $p<0.05$) increase in blood glucose levels GCas and GSem ($F=11.26$, $p<0.01$), and reduction of calcium levels in GSem ($F=6.095$, $p<0.05$). The placentas analysis indicated an increase in triglyceride levels in the GCas ($F=5.032$, $p<0.005$). These data, taken together, suggest that the reconstituted *Caesalpinia ferrea* dry hydroalcoholic extract are not safe when administered to rats during the gestation period.

Keywords: *Caesalpinia ferrea*. Biochemical measurements. Oxidative stress. Reproduction toxicology. *In vivo* assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto da <i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>leyotachia</i> Benth.....	15
Figura 2 – Representação esquemática da <i>Caesalpinia ferrea</i>	16
Figura 3 – Estrutura química de constituintes terpenóides isolados das folhas <i>Caesalpinia ferrea</i>	22
Figura 4 – Estrutura química do ácido elágico 2-(2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) isolado dos frutos da <i>Caesalpinia ferrea</i>	22
Figura 5 – Estrutura química do ácido gálico e galato de metila isolados dos frutos e folhas da <i>Caesalpinia ferrea</i>	23
Figura 6 – Estrutura química de constituintes flavonoides isolados das folhas da <i>Caesalpinia ferrea</i>	24
Figura 7 – Estrutura química de constituintes pauferrol A (Chalcona) isolado do caule da <i>Caesalpinia ferrea</i>	24
Figura 8 – Patentes solicitadas para a espécie vegetal <i>Caesalpinia ferrea</i>	30
Figura 9 – Fluoxograma do estudo.....	32
Figura 10 – Preparação do extrato hidroalcoólico seco reconstituído da <i>Caesalpinia</i> <i>ferrea</i>	34
Figura 11 – Isoladores micro ambientais Alesco®.....	35
Figura 12 – Espermatozoides no lavado vaginal: Indicativo do primeiro dia de gestação.....	36
Figura 13 – Procedimento de cesárea realizada ao 20º dia de prenhez	38
Figura 14 – Retirada de ovários e contagem de corpos lúteos.....	39
Figura 15 – Retirada de fetos sem rompimento do saco gestacional	40
Figura 16 – Coleta de líquido amniótico do interior do saco gestacional de fetos de ratas ..	41
Figura 17 – Evolução de peso de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de <i>Caesalpinia ferrea</i> durante o período de gestação	48
Figura 18 – Útero de rata com reabsorção fetal.....	50
Figura 19 – Avaliação de vitalidade fetal.....	51
Figura 20 – Curva padrão utilizada para cálculo de concentração da GSH.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Performance reprodutiva de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de <i>Caesalpinia ferrea</i> durante o período de gestação.....	49
Tabela 2 – Análise bioquímica materna realizada em soro de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de <i>Caesalpinia ferrea</i> durante o período de gestação.....	52
Tabela 3 – Índices hematimétricos de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de <i>Caesalpinia ferrea</i> durante o período de gestação.....	53
Tabela 4 – Parâmetros de estresse oxidativo em sangue de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de <i>Caesalpinia ferrea</i> durante o período de gestação.....	54
Tabela 5 – Análise bioquímica fetal realizada em líquido amniótico de fetos de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de <i>Caesalpinia ferrea</i> durante o período de gestação.....	55
Tabela 6 – Análise bioquímica fetal realizada em placenta de fetos de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de <i>Caesalpinia ferrea</i> durante o período de gestação.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT – Alanina aminotransferase
AST – Aspartato aminotransferase
ATP – Adenosina trifosfato
cm – Centímetros
CIM – Concentração Inibitória Mínima
dL – Decilitro
DL50 – Dose letal para matar 50% da população
DTNB – Ácido ditiobisnitrobenzóico
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EI – Espectroscopia no Infravermelho
EM – Espectrometria de Massa
g – Gramas
GC – Grupo controle
GCas – Grupo tratado com casca
GLDH – Glutamato desidrogenase
GP – Ganho de Peso
GSem – Grupo tratado com semente
GSH – Glutathione reduzida
Hb – Hemoglobina
HDL – Lipoproteínas de alta densidade
IC10 – Concentração Inibitória Máxima para matar 10% das células
IC50 – Concentração Inibitória Máxima para matar 50% das células
INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial
kg – Quilograma
KV - Quilovolt
L – Litro
LDH – Lactato desidrogenase
LDL – Lipoproteínas de baixa densidade
MDH – Malato desidrogenase
mg – Miligrama
mL – Mililitro
mmol – Milimolar

MO – Medula óssea

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Hidreto

NAD⁺ – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

nm – Nanômetro

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPM – Rotações por minuto

SUS – Sistema Único de Saúde

TCA – Ácido tricloroacético

U – Unidade

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

µg – Micrograma

µL – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 <i>Caesalpinia ferrea</i>	15
2.1 Identificação	15
2.2 Informações botânicas.....	17
2.2.1 Descrição macroscópica.....	17
2.2.2 Descrição microscópica.....	18
2.3 Controle de qualidade.....	20
2.3.1 Prospeção fitoquímica	21
2.4 Segurança e eficácia	25
2.4.1 Usos populares/tradicionais.....	25
2.4.2 Ensaios pré-clínicos.....	26
2.5 Formas farmacêuticas e formulações descritas na literatura.....	29
2.6 Patentes solicitadas.....	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Delineamento experimental.....	32
4.2 Material vegetal e obtenção do extrato	33
4.3 Animais.....	35
4.4 Avaliação da evolução da gestação de ratas	36
4.4.1 Acasalamento.....	36
4.4.2 Prenhez e exposição à droga vegetal	36
4.4.3 Procedimento de cesárea e coleta de sangue materno	37
4.4.4 Avaliação da capacidade reprodutiva, toxicidade materna e toxicidade fetal...39	
4.4.4.1 Processamento de material para análise de toxicidade	42
4.4.4.2 Análises bioquímicas automatizadas.....	43
4.4.4.3 Avaliação de estresse oxidativo.	46
4.5 Análise Estatística	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Efeitos da exposição à <i>Caesalpinia ferrea</i> sobre a capacidade reprodutiva	48
5.2 Efeitos da exposição à <i>Caesalpinia ferrea</i> sobre a toxicidade materna	51
5.3 Efeitos da exposição à <i>Caesalpinia ferrea</i> sobre a toxicidade fetal.....	54
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO A – Ficha de catalogação da <i>Caesalpinia ferrea</i> no herbário da UFRN.....	73
ANEXO B – Certificado de procedência de animais.....	74

ANEXO C – Atestado de saúde animal	75
ANEXO D – Certificado de aprovação em CEUA-Uniso	76
ANEXO E – Certificado de palestra proferida em curso de graduação “Curva de calibração”	77
ANEXO F – Certificado de palestra proferida em curso de graduação “Fármacos hipoglicemiantes e anti-hiperglicemiantes e determinação da glicemia”	78
ANEXO G – Certificado de palestra proferida em curso de graduação “Análise bioquímica em equipamento Cobas (Roche)”	79
ANEXO H – Certificado de participação como examinador na banca “Avaliação bioquímica da exposição ao extrato hidroalcoólico de <i>Psidium guajava</i> Linn durante a gestação de ratos”	80
ANEXO I – Certificado de participação como examinador na banca “Análise fitoquímica e físico-química da <i>Psidium guajava</i> Linn”	81
ANEXO J – Certificado de participação como examinador na banca “Avaliação da concentração de quercetina em amostras de chá branco e chá vermelho a base da planta <i>Camellia sinensis</i> ”	82
ANEXO K – Certificado de apresentação de trabalho no Toxi-Latin 2014	83
ANEXO L – Artigo “Reproductive performance of pregnant rats: effects of <i>Morus nigra</i> tincture” publicado na revista Reproductive Toxicology	84
ANEXO M – Artigo “Skeletal hypoplasia and visceral changes in rats exposed to <i>Psidium Guajava</i> Linn during gestation” publicado na revista ReproductiveToxicology	85
ANEXO N – Artigo “Alterations in the reproductive performance of the female rats and fetotoxicity of <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)” publicado na revista Reproductive Toxicology	86
ANEXO O – Certificado de participação como examinador na banca “Shiitake como nutracêutico: Avaliação da segurança do seu consumo in vivo através de parâmetros hematológicos”	87
ANEXO P – Certificado de participação como examinador na banca “Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de frutas usualmente consumidas pela população”	88

1 INTRODUÇÃO

A espécie vegetal *Caesalpinia ferrea* é constante da Relação de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde – SUS. Em 2006, duas importantes políticas que dizem respeito à Plantas Medicinais e Fitoterápicos foram publicadas - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PORTARIA GM Nº 971, DE 02/05/2006), que prevê em especial a inserção de serviços relacionados às Plantas Medicinais e Fitoterapia, e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (DECRETO PRESIDENCIAL 5.813 DE 22 DE JUNHO DE 2006), cujo objetivo é garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.

No intuito de definir as ações, os prazos, os recursos e os Ministérios e órgãos gestores envolvidos com a implantação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, foi elaborado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovado em 10 de dezembro de 2008, por meio da Portaria Interministerial nº 2.960. Entre as ações previstas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, destacam-se: a garantia do monitoramento da qualidade dos fitoterápicos; o incentivo à pesquisa e desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país; promoção do uso racional de plantas medicinais e dos fitoterápicos no SUS; acompanhamento e avaliação da inserção e implementação das plantas medicinais e fitoterapia no SUS.

Não há monografias em Farmacopeias Oficiais Brasileiras para os derivados da *Caesalpinia ferrea*, embora possua notificação para droga vegetal (com indicação para o uso oral e prolongado) e solicitações de registro no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Portanto, torna-se necessária a realização de outras avaliações biológicas para comprovação de sua indicação terapêutica e de segurança.

Desta forma esta pesquisa se propôs a realizar testes de toxicidade pré-clínica, os quais são necessários para a avaliação de segurança da exposição sobre a mãe e sobre o conceito (FIOL; GERENUTTI; GROppo, 2005; GERENUTTI; SPINOSA; BERNARDI, 1992) afim de auxiliar na normalização da *Caesalpinia ferrea* como droga vegetal (BRASIL, 2010).

2 *Caesalpinia ferrea*

2.1 Identificação

A *Caesalpinia ferrea* Mart. (*Caesalpinia ferrea* Martus ex. Tulasne var. *leiostachya* Benth; sinonímia botânica: *Libidibia ferrea*) pertence à Família das Leguminosae (Fabaceae Lind.), e à Subfamília: Caesalpinioideae (LORENZI, 1998; MOBOT, 2012).

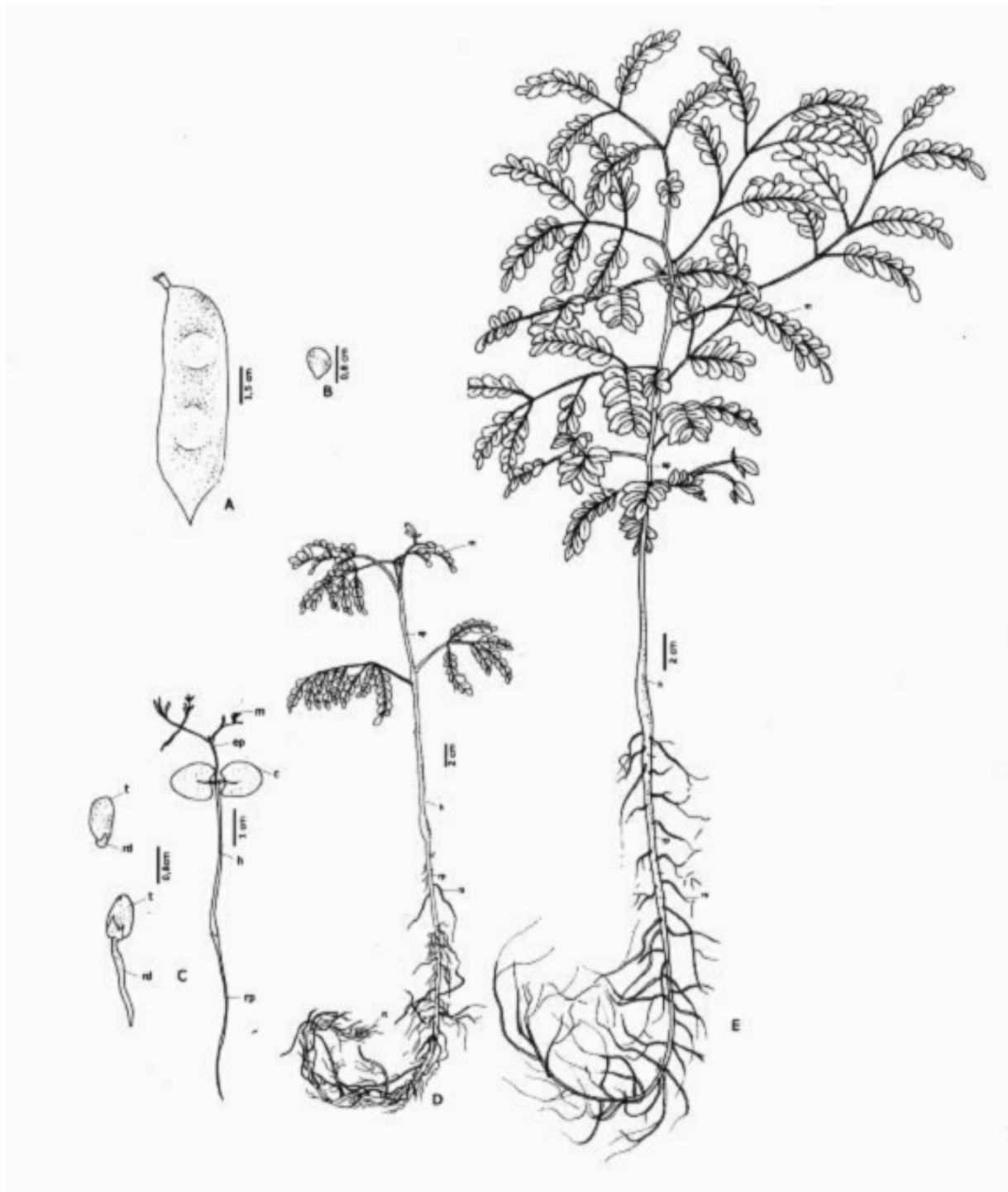
Figura 1 – Foto da *Caesalpinia ferrea* var. *leyotachia* Benth



Nota: A: vista parcial. B: detalhe de um ramo, com inflorescência. C: inflorescência com botões florais.

Fonte: Adaptado de Zaia HABA. Desenvolvimento floral de *Caesalpinia echinata* LAM, *Caesalpinia peltophoroides* BENTH e *Caesalpinia ferrea* var. *leyotachia* BENTH. (Fabaceae/ Caesalpinioideae) [dissertação]. Piracicaba: Universidade De São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz De Queiroz”, 2004.

Figura 2 – Representação esquemática da *Caesalpinia ferrea*



Nota: A: fruto. B: semente. C: fases de germinação. D: planta jovem -30 dias. E: muda - 120 dias; legenda: rp: raiz principal, t: tegumento, rd: radícula, rs: raiz secundária, m: metáfilos, h: hipocótilo, ep: epicótilo, c: cotilédones.

Fonte: Adaptado de Braz MSS. Morfologia, germinação e produção de mudas de leguminosas arbóreas ocorrentes na mata do Pau-Ferro, Areia, Paraíba [tese]. Paraíba: Universidade Federal da Paraíba/Areia, 2007.

No Brasil, a espécie *Caesalpinia ferrea* é conhecida popularmente como pau-ferro, jucá, ibirá-obi, imirá-itá, muirá-obi, muiré-itá; sendo uma espécie que cresce em todo o país e é largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, principalmente em Pernambuco e no Ceará. A árvore é bastante ornamental, podendo ser empregada na arborização de ruas e avenidas e, aproveitada para plantios em áreas degradadas, além de fornecer lenha e madeira para construção civil (PIO CORREA, 1984). Além disso, o pau-ferro é considerado uma forrageira importante no Nordeste, tanto pela sua adaptação natural à região, como também por fornecer forragem durante a seca (DE OLIVEIRA, 2008).

2.2 Informações botânicas

2.2.1 Descrição macroscópica

É uma espécie vegetal de grande porte, com tronco liso e cerne duro, podendo chegar a 10-15 metros de altura, com tronco de 40 a 60 cm de diâmetro o qual possui manchas claras; folhas bipinadas com folíolos oblongos, ovalados ou obovais; frutos de cor marrom escura, do tipo legume (vagem) com sementes escuras; flores amarelas pequenas e em cachos (LORENZI, 1998).

As folhas são bipinadas paripinadas, opostas, medindo 14 – 20 cm. Os folíolos são opostos a subopostos, sésseis, 6-8 jogados, lâmina de 0,5 a 0,7 cm de largura e 0,9 a 1,3 cm de comprimento, obovada, de ápice retuso a obtuso, de base inequilátera, margem inteira, verde opalescente nas 2 faces, venação curvivenia, com nervura central ligeiramente impressa na face superior e algo saliente na face inferior. As nervuras secundárias, em número de 7 a 8 pares, são opostas ou subopostas, pouco proeminentes na face abaxial. Pulvinos e pulvínulos são evidentes (CURY, 2002).

A casca do lenho apresenta parênquima axial visível somente sob lente de 10x, paratraqueal califorme linear, confluyente, formando faixas longas estreitas e irregulares e também confluyente em trechos curtos. Raios visíveis somente sob lente de 10 x, finos e poucos. Poros visíveis somente sob lente de 10 x, pequenos, pouco numerosos, porosidade difusa, solitários e múltiplos. No plano longitudinal tangencial

os raios são visíveis somente sob lente de 10x, baixos, estratificados, e linhas vasculares irregulares. No plano longitudinal radial, o espelhado dos raios é contrastado. Camadas de crescimento distintas individualizadas eventualmente por linhas finas de parênquima confluyente e zonas fibrosas tangenciais mais escuras (CURY, 2002).

A superfície externa do caule das partes aéreas, de menor diâmetro, apresenta coloração marrom com diferentes lenticelas de forma lenticular. No caule de 1 a 2 mm de diâmetro, em secção transversal e longitudinal, observada a vista desarmada ou com auxílio de lupa, encontram-se 4 regiões de coloração distinta onde se pode destacar a medula e poros difusos (CURY, 2002).

A vagem apresenta legume bacóide, liso, achatado, seco, negro na maturação indeiscente com mesocarpo polposo, pesando de 4,41 a 14,24 g, com 3,8 a 9,3 cm comprimento por 1,02 a 2,93 cm de largura, com uma a quatro sementes. Estas, subelípticas a oblongas, marrom-escuras a negras, brilhantes, medindo 0,7 a 0,9 cm de comprimento por 0,4 a 0,5 cm de largura, dispostas transversalmente em relação ao eixo longitudinal do fruto. Funículo com hilo visível, circular, escuro. Embrião reto, axial, pardo-amarelado com eixo hipocótilo-radícula reto, cotilédones verdes, planos de textura foliácea com plúmulas diferenciadas em pinas (BRAZ, 2007).

2.2.2 Descrição microscópica

A epiderme dos folíolos, em corte transversal, apresenta-se uniestratificada, constituída por células de contorno retangular, alongadas no sentido periclinal, revestidas por cutícula lisa. Na região de nervura mediana, as células evidenciam-se aproximadamente arredondadas. As paredes periclinais externas das células epidérmicas são espessadas em ambas as faces da lâmina, e na face abaxial, observa-se convexidade evidente. Em vista frontal, o contorno mostra-se sinuoso. A sinuosidade revela-se acentuada na face abaxial. Tricomas glandulares pluricelulares, sésseis, localizados em ligeiras depressões, são observados, algumas vezes nesta face. Estas estruturas não apresentam espaços conspícuos. A folha é hipoestomática. Os estômatos que ocorrem no mesmo nível das demais células epidérmicas apresentam-se circundados por 2 a 4 células, predominado os paracíticos. O mesófilo é constituído de 4 a 5 camadas de parênquima paliádico. Algumas destas células,

junto às duas faces, sofrem divisões periclinais, sendo que as células mais externas contêm drusas de oxalato de cálcio. Os feixes vasculares de menor calibre apresentam bainha cristalífera. No mesófilo encontram-se frequentemente drusas e raros cristais prismáticos, além de idioblastos com conteúdo marrom. Estes últimos, após tratamento com reativo contendo ácido sulfúrico, adquirem forma cristalina acircular. A nervura mediana é aproximadamente plano-convexa. As células epidérmicas que recobrem esta região são comparativamente menores, observado, em seguida, 2 a 3 camadas de parênquima paliçádico, junto à face axial, encontra-se células arredondadas de paredes delgadas, delimitando meatos. No xilema, os elementos de vaso estão dispostos em fileiras radiais e separados por 1 a 2 fileiras de células parenquimáticas. No floema, observa-se grande número de drusas. Externamente a esta região, observa-se calota fibrosa conspícua. Fenólicos são abundantes nas células paliçádicas mais externas, principalmente junto à face adaxial (GONZALEZ, 2005).

A casca do lenho possui vasos com porosidade difusa, arranjo tangencial, solitários na maioria, forma da secção arredondada, placas de perfuração simples, diâmetro tangencial de 92,6 μm , elementos vasculares com 0,3 mm de comprimento, com ausência de apêndices, tilos abundantes, depósitos nos vasos abundantes com cor marrom escura, pontuações intervasculares alternas arredondadas, com diâmetro tangencial de 8,3 μm , pontuações radiovasculares semelhantes às intravasculares. Parênquima axial aliforme losangular confluyente, formando faixas em linhas de parênquima marginal. Fibras com 1,1 mm de comprimento e paredes muito espessas. Raios bi e trisseriados, com altura de 0,184 mm, homocelulares, com todas as células procumbentes, estratificados. Cristais em células do parênquima axial. Sílica presente no parênquima radial. Camadas de crescimento individualizadas pela variação do lume das fibras (CURY, 2002).

O caule das partes aéreas possui de 1 a 2 mm de diâmetro, o súber é constituído por células espessadas, suberizada, de contorno aproximadamente retangular, alongadas ao sentido periclinal, intercaladas com faixas de células de contorno quadrangular. Nesta região podem ser observadas de cinco a vinte camadas de células. A feloderme é constituída de até 10 camadas de células espessadas de paredes celulósicas, achatadas, alongadas no sentido tangencial. Nesta região, observa-se grande número de drusas e cristais prismáticos. O parênquima cortical é constituído de células de diferentes formas e tamanhos, delimitando meatos. Nesta

região observam-se frequentemente drusas e raros cristais prismáticos. Externo à região floemática, encontra-se anel esclerenquimático, contínuo, constituído predominantemente de fibras, intercaladas com esclereídes, providos de pontuações simples e ramificadas. O floema é constituído de elementos de condução e parênquima. Os raios floemáticos formados 1-3 células em largura, contêm abundantes drusas e raros cristais prismáticos (GONZALEZ, 2005).

O xilema apresenta elementos de vasos geralmente arredondados, solitários e/ou múltiplos radiais, em arranjo difuso. No material dissociado podem ser observadas drusas, elementos de condução com espessamento espiralado, reticulado e providos de pontuações areoladas ou guarnecidas. Nos caules de diâmetro menor que 2 mm, observa-se no xilema um parênquima axial em faixas tangenciais, descontínuas, irregularmente espaçadas e arranjo paratraqueal escasso a vasicêntrico, já em caules de diâmetro maior, há predominância do parênquima em faixas contínuas. Raios geralmente unisseriados e parênquima radial heterogêneo, constituído de evidentes células procumbentes e quadradas. O parênquima medular é formado de células de diferentes tamanhos delimitando meatos contendo ocasionais cristais prismáticos e frequentes amiloplastos (GONZALEZ, 2005).

2.3 Controle de qualidade

Frasson, Bittencourt e Heinzmann (2003) apontam que o índice de amargor encontrado no caule da *Caesalpinia ferrea* Mart. é de 1,68 unidades/grama, e embora não seja considerada “fortemente amarga”; a casca do caule, quando transformada em droga, apresenta-se inodora, com densidade maior que a água, e mantém o sabor amargo e adstringente (GONZALEZ, 2005).

Em análise realizada por Frasson, Bittencourt e Heinzmann (2003) o teor de cinzas insolúveis em ácido foi de 0,153% ou 1,53 mg/kg. Na contagem de microrganismos viáveis em placas, obtiveram quantidades inferiores a 10 UFC/g para bactérias e $8,03 \times 10^2$ UFC/g para fungos.

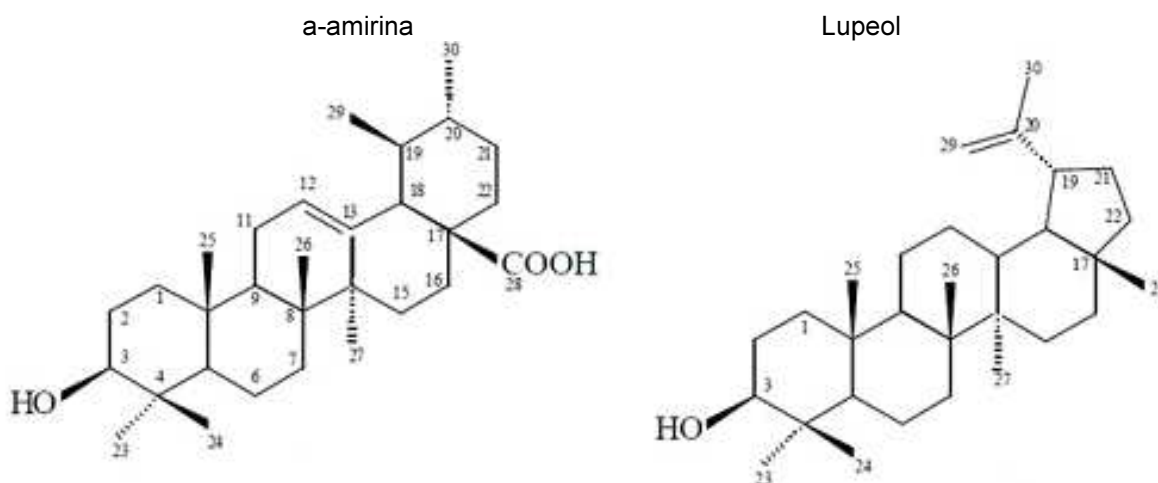
2.3.1 Prospecção fitoquímica

A espécie apresenta esteróides (sitosterol), flavonas, flavonóis, flavanonas, flavononóis, saponinas, taninos e xantonas (SOUZA, 2005). No extrato bruto do caule, Gonzalez (2005) detectou flavonoides e taninos; nas folhas, identificou flavonoides, taninos, além de antraderivados e cumarinas.

Gonzalez (2005) utilizando método preconizado pela *European Pharmacopoeia* (2001) encontrou as seguintes porcentagens de taninos; Extrato bruto das folhas - 7,13%, extrato liofilizado das folhas - 23,95%, extrato bruto do caule - 2,26% e extrato liofilizado do caule - 11,77%. Bacchi e Sertié (1994) utilizaram o método de precipitação com solução de gelatina a 1% e encontraram 9,2% de taninos no extrato liofilizado do caule. Utilizando o método preconizado pela Farmacopeia Brasileira, Gonzalez (2005) calculou a porcentagem de flavonoides em relação à quercetina e obteve 0,0095% no extrato bruto e 0,026% extrato liofilizado das folhas; e 0,00014% no extrato bruto e 0,0017% no extrato liofilizado do caule. Bacchi e Sertié (1994) utilizaram o método de precipitação com éter e obtiveram 4,7% de saponinas no extrato liofilizado do caule.

Os componentes químicos descritos para a *Caesalpinia ferrea* são terpenos, taninos e ácidos fenólicos, flavonoides C-glicosilados e lectinas. Rivera (1999), em estudo fitoquímico das folhas de *Caesalpinia ferrea*, isolou um constituinte amarelo que, através de análises por Espectrometria de Massa (EM) e por análises, tanto experimentais, quanto teóricas, de Espectroscopia no Infravermelho (EI) e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), permitiu caracterizá-lo como o sesquiterpenóide trans,trans-farnesol. Por outro lado, Coelho (2004), em estudo fitoquímico das folhas de *Caesalpinia ferrea*, identificou em RMN três triterpenos: lupeol, a- e b-amirina (Figura 3).

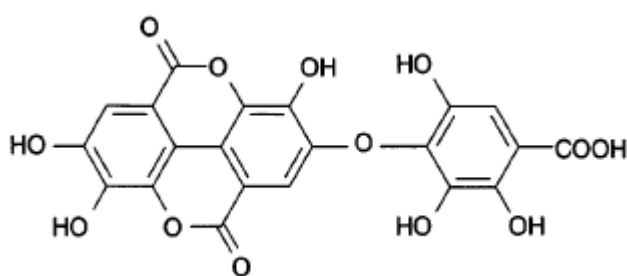
Figura 3 – Estrutura química de constituintes terpenóides isolados das folhas *Caesalpinia ferrea*



Fonte: Coelho RG. Estudo químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae) [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, 2004.

Ueda et al. (2001) isolaram do extrato aquoso dos frutos secos de *Caesalpinia ferrea* (500g) o ácido elágico 2-(2,3,6-Trihidroxi-4-carboxifenil) (Figura 4), com capacidade de inibir a aldose redutase.

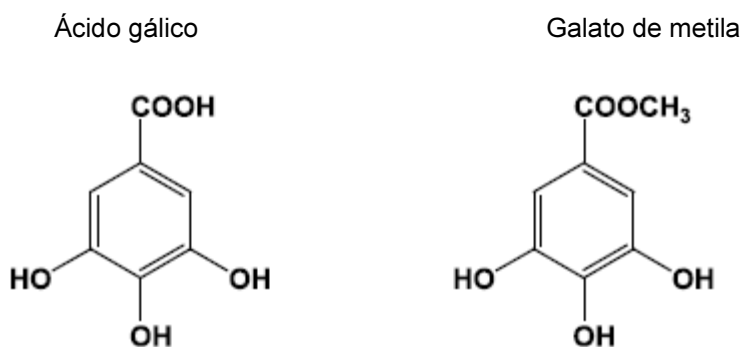
Figura 4 – Estrutura química do ácido elágico 2-(2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) isolado dos frutos da *Caesalpinia ferrea*



Fonte: Ueda H, Kawanishi K, Moriyasu M. Effects of ellagic acid and 2-(2,3,6-trihydroxy-4-carboxyphenyl) ellagic acid on sorbitol accumulation *in vitro* and *in vivo*. Biol Pharm Bull 2004 Oct; 27(10):1584-7.

Nakamura et al. (2002) avaliaram o extrato metanólico dos frutos de *Caesalpinia ferrea* e identificaram dois compostos: o ácido gálico e galato de metila (Figura 5), que apresentaram ação *in vitro* sobre o vírus Epstein–Barr; Coelho (2004) em estudo fitoquímico das folhas de *Caesalpinia ferrea*, também identificou o galato de metila, que pode ser o precursor biossintético de metabólitos secundários naturais (cumarinas, lignanas e neolignanas), segundo Dewick (1998).

Figura 5 – Estrutura química do ácido gálico e galato de metila isolados dos frutos e folhas da *Caesalpinia ferrea*

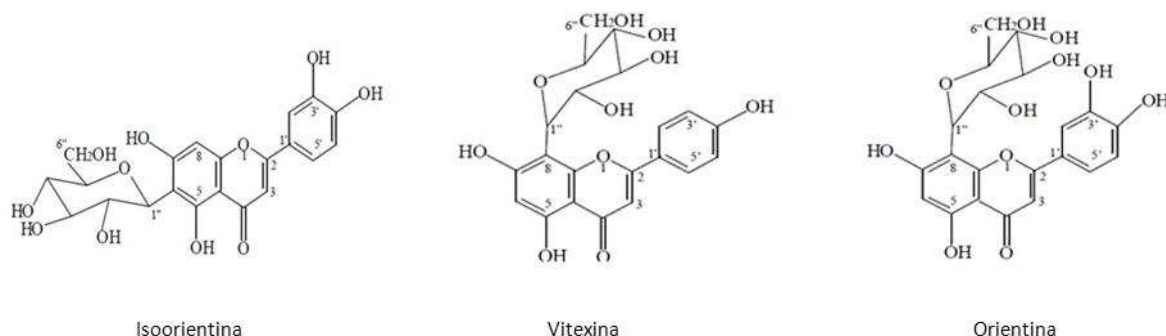


Fonte: Coelho RG. Estudo químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae) [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, 2004.

Nakamura ES, Kurosaki F, Arisawa M, Mukainaka T, Takayasu J, Okuda M, Tokuda H, Nishino H, Pastore F. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on *in vivo* two-stage skin carcinogenesis. J Ethnopharmacol. 2002 Jun; 81(1):135-7.

Coelho (2004), em estudo fitoquímico das folhas de *Caesalpinia ferrea*, identificou em RMN, três flavonoides C-glicosilados: isoorientina, orientina e vitexina (Figura 6).

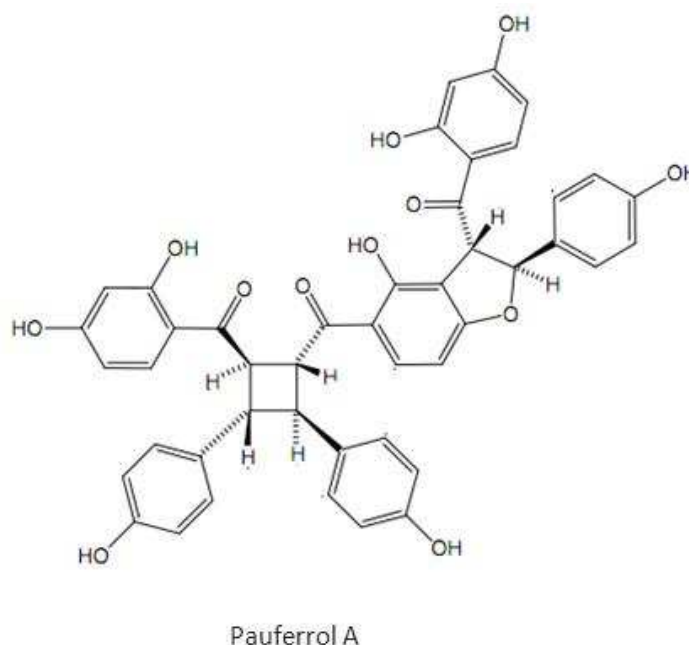
Figura 6 – Estrutura química de constituintes flavonoides isolados das folhas da *Caesalpinia ferrea*



Fonte: Coelho RG. Estudo químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae) [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, 2004.

Nozaki et al. (2007) isolaram o Pauferrol A (Figura 7), uma chalcona precursora da via de biossíntese de flavonoides, da fração etanólica do extrato do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart., que se apresenta como um pó amarelo e amorfo.

Figura 7 – Estrutura química de constituintes pauferrol A (Chalcona) isolado do caule da *Caesalpinia ferrea*



Fonte: Nozaki H, Hayashi K-i, Kakumoto K, Ikeda S, Kido M, Tani H, Matsuura N, Takaoka D, Iinuma M, Akao Y. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. *Tetrahedron Lett.* 2007; 48(47):8290-92.

Os terpenos (Lupeol e α -amirina) e flavonoides (isoorientina, orientina e vitexina) parecem ser os princípios majoritários ou ativos (COELHO, 2004; DEWICK, 1998; NAKAMURA et al., 2002; UEDA et al., 2001).

Bacchi e Sertié (1994) citam que as formas habituais de uso da *Caesalpinia ferrea* Mart. são o infuso, o decocto, o extrato fluido e a tintura, neste sentido, os principais derivados utilizados são o extrato aquoso e o extrato hidroalcoólico da casca do lenho.

2.4 Segurança e eficácia

2.4.1 Usos populares/tradicionais

No Piauí, a espécie é utilizada para tratamento de feridas e contusões e, em Alagoas, é utilizada para a tosse crônica, asma e como cicatrizante (PIO CORREA, 1984). Bacchi e Sertié (1991) citam que a *Caesalpinia ferrea* Mart. é, há muito tempo, utilizada na medicina popular como cicatrizante e no tratamento de úlcera gastroduodenal; Carvalho (1993) ressalta a utilização popular desta planta em vários processos inflamatórios. Storey e Salem (1997), em estudo etnofarmacológico realizado no estado do Amazonas, indicaram que a *Caesalpinia ferrea* era uma das treze plantas mais utilizadas para o tratamento da tuberculose. Além disto, seu uso tradicional sugeria a utilização para tratamento sintomático de lesões cutâneas e de mucosas, bem como o tratamento de glicosúria (CARVALHO et al., 2010).

Segundo Braga (1960) a casca é utilizada como adstringente e cicatrizante. O decocto é usado internamente como antidiarreico. O preparado da casca com 1 litro de água e 1 kg de açúcar, aquecido até formar um xarope, é utilizado contra asma e bronquite. A infusão conjunta da raspa da casca com folhas de manga é utilizada como antigripal e antitussígena, enquanto que os preparados das cascas de jucá, cascas de jatobá, folhas de manga, açúcar e água, após aquecimento, são utilizados como anticatarral e no tratamento de feridas.

Casca e sementes do pau-ferro são usadas na medicina popular, na forma de chá e de garrafadas, para emagrecer, como depurativo e para contusões (BARROS,

1982). Nakamura et al. (2002) estudaram nas cascas dois componentes extraídos do Pau ferro, o ácido gálico e metil galato, que apresentaram atividade antitumoral e antiviral (DE SOUZA, 2009).

O decocto das folhas na região Amazônica, é utilizado externamente contra hemorroidas, enquanto que o uso interno desta decocção é útil contra amebíase e problemas hepáticos, além de ser usado como fortificante para crianças. O sumo das folhas é usado internamente para problemas cardíacos. A infusão de folhas e de frutos é utilizada para o tratamento de inflamações do fígado e tuberculose. Na região da Mata Atlântica, a infusão das folhas da espécie é usada para problemas respiratórios, especialmente bronquites, além do uso comum contra gripes, resfriados e tosse (DI STASI et al, 2000).

O fruto combate a anemia e as afecções hemoptísicas pulmonares (tosses seguidas de sangue), além de possuir propriedades béquicas e antidiabéticas (REIS, 2001). As raízes tem ação febrífugas e antidiarreica (REIS, 2001). A vagem *in natura* é utilizada contra tosse, inflamações do fígado e baço, desarranjo menstrual, problemas renais e menstruais (SANGUINETTI, 1989).

2.4.2 Ensaios pré-clínicos

Gonzalez (2005) e Souza et al. (2006) realizaram estudos de toxicidade aguda. O estudo de Gonzalez (2005) foi realizado com o extrato bruto de folhas e caule com camundongos Swiss, enquanto Souza et al. (2006) testou o extrato aquoso dos frutos em ratos Wistar. Ambos relatam que a *Caesalpinia ferrea* não apresentou toxicidade aguda para as doses utilizadas. Neste sentido, Gonzalez (2005), Silva (2008) e Cavalheiro et al. (2009) utilizaram os extratos brutos das diversas partes vegetais: folhas, vagens e sementes, respectivamente; todos os ensaios foram realizados com camundongos. A DL50 em todos os ensaios ficou acima de 2,5 g/Kg, com indicação dos autores de baixa toxicidade da *Caesalpinia ferrea*.

Estudos de toxicidade subcrônica foram realizados por Gonzalez (2005) com o extrato bruto de folhas e caules, por Bacchi et al. (1995) com extrato de caule e por Souza (2005) com droga vegetal diluída em água. Nos três estudos, a espécie estudada foi o rato Wistar (machos e fêmeas); os parâmetros de toxicidade subcrônica

incluíram avaliações: anatomopatológicas, bioquímicas, ensaios comportamentais e, ensaios sobre a reprodução, os autores afirmam que os resultados indicaram baixa toxicidade subcrônica da *Caesalpinia ferrea*.

Lucinda et al. (2010) em estudo de toxicidade crônica utilizando o extrato aquoso dos frutos observaram uma ausência de toxicidade sobre o aparelho reprodutor masculino em ratos.

Foram realizados ensaios *in vivo* com a *Caesalpinia ferrea*, utilizando modelos de avaliação das atividades: cicatrizante, antitumoral e imunossupressora, anti-inflamatória, antiúlcera, colerética, hipoglicemiante e anti-hiperglicemiante, hipotensora.

Carvalho et al. (1996) avaliou a atividade anti-inflamatória da *Caesalpinia ferrea*, utilizando o extrato aquoso dos frutos na dose de 300 mg/kg em ratos e camundongos pelo método de edema de pata (analgesia e inflamação) induzida por carragenina. Um estudo com o extrato bruto aquoso e de uma fração (F80) da vagem da *Caesalpinia ferrea* foi feito por Silva (2008) em camundongos com peritonite induzida por carragenina e contorções abdominais induzidas por ácido acético. Já Silva (2009) estudou a lectina isolada e o extrato bruto das folhas para avaliar o potencial. Todos os ensaios de avaliação da atividade anti-inflamatória, de acordo com os autores, apresentaram resultado positivo, ou seja, uma redução do processo inflamatório e um potencial de analgesia.

Foram encontrados trabalhos de Da Silva (2009), Queiroz et al. (2001) e Nakamura et al. (2002) onde os autores avaliaram a atividade antitumoral e imunossupressora da *Caesalpinia ferrea*. O extrato bruto foi administrado em camundongos por Da Silva (2009) para avaliar a diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea (MO) para a série granulócito-macrófago (CFU-GM) através da utilização de um modelo tumoral (tumor de Ehrlich) e de um modelo de infecção (*Listeria monocytogenes*), resultando em um aumento da resistência dos animais devido ao aumento nos números de CFU-GM da MO. Queiroz et al. (2001) utilizando o extrato aquoso da *Caesalpinia ferrea*, em ratos e camundongos, evidenciaram aumento da resistência dos animais inoculados com tumor de Ehrlich, bem como, observaram proteção contra a dose letal de *Listeria monocytogenes*. Camundongos em estágio 2 de câncer de pele receberam ácido gálico e metil galato, compostos isolados dos frutos, e apresentaram uma diminuição significativa no número de papilas tumorais (NAKAMURA et al., 2002).

A atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea*, foi realizada por De Oliveira (2008) que utilizou as cascas secas em preparação com vaselina em caprinos e por Gonzalez (2005) que utilizou extrato bruto de caule e folhas em roedores; nos dois estudos a via de administração foi tópica. O modelo farmacológico de avaliação da atividade cicatrizante consiste na aplicação das preparações de *Caesalpinia ferrea* sobre as áreas de incisão. Nos ensaios realizados, apenas em caprinos foi observado efeito significativo sobre a cicatrização.

Bacchi e Sertié (1994) e Bacchi et al. (1995) estudaram o extrato hidroalcoólico do caule da *Caesalpinia ferrea* em ratos Wistar a fim de estudar sua atividade antiúlcera. Gonzalez (2005) utilizou o extrato bruto de caule e extrato bruto de folhas também em ratos para avaliar a lesão gástrica induzida pela administração de uma solução 0,3 M de ácido clorídrico com etanol a 60%, como agentes ulcerogênicos. Bacchi e Sertié (1994), Bacchi et al. (1995) e Gonzalez (2005) relataram diminuição de secreção gástrica, redução da ulceração e aumento de fibras de colágeno em seus estudos.

Para a avaliar a atividade hipoglicemiante, Almeida e Agra (1986), realizaram administração por via oral dos extratos etanólicos e aquosos da folhas em ratos, e utilizaram o método da ortuluidina. Ueda, Kawanishi e Moriyasu (2004) administraram composto isolado dos frutos (ácido elágico) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. O extrato aquoso foi administrado em ratos diabéticos aloxano-induzidos em estudo realizado por Carvalho et al. (2010). Os autores não encontraram efeito hipoglicemiante. A atividade hipoglicemiante foi observada apenas por Souza et al. (2009) após a administração oral de extratos aquosos da casca do caule à ratos diabetes aloxano induzida.

A indução de hipotensão e da vasodilatação de artéria mesentérica em ratos normotensos, promovida pelo extrato aquoso da casca do caule de *Caesalpinia ferrea*, foi observada por Menezes et al. (2007).

Pavan et al. (2009) em ensaios de atividade antimicrobiana realizados *in vitro* com a *Caesalpinia ferrea* definiram a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a *Mycobacterium tuberculosis* como 4000 ug/mL e Sampaio et al. (2009) observaram que o extrato aquoso da fruta foi capaz de inibir o crescimento de organismos patógenos orais. Os ensaios destes achados corroboram com a utilização popular da *Caesalpinia ferrea* no tratamento de lesões de diversas naturezas.

Dois artigos indicaram a IC50 da *Caesalpinia ferrea*, em células humanas (eritrócitos e células leucêmicas), utilizando compostos isolados do fruto (ácido elágico) (UEDA; KAWANISHI; MORIYASU, 2004) e do caule (paufferol A) (NOZAKI et al., 2007). Gonzalez (2005) avaliou e confirmou a atividade antioxidante, em células de roedor, do extrato bruto do caule e folhas; e Cavalheiro et al. (2009) que avaliou a atividade do extrato bruto das sementes em eritrócitos de rato, indicando atividade celulásica, amilásica e anticoagulante.

Os extratos de *Caesalpinia ferrea* apresentaram atividade anti-inflamatória, cicatrizante, antitumoral e antimicrobiana em testes pré-clínicos *in vivo*. Os ensaios *in vitro* evidenciaram o potencial terapêutico para a utilização em uso tópico dos diversos extratos de *Caesalpinia ferrea*.

2.5 Formas farmacêuticas e formulações descritas na literatura

Preparações contendo o extrato das folhas de *Caesalpinia ferrea* não são frequentes. Alguns autores citam o Fimatosan solução, um composto com apresentação em associação de extratos: extrato fluido de jucá (*Caesalpinia ferrea*) 0,100 mL; extrato fluido de agrião (*Nasturtium officinale*) 0,030 mL; extrato fluido de guaco (*Mikania glomerata*) 0,030 mL; extrato fluido de cambará (*Lantana camara*) 0,030 mL; extrato fluido de maracujá (*Passiflora alata*) 0,020 mL; extrato fluido de erva-silvina (*Polypodium vacciniifolium*) 0,030 mL; extrato fluido de óleo-vermelho (*Myrospermum erytroxilon*) 0,020 mL (DE MELLO e DE MELLO, 2006).

2.6 Patentes solicitadas

As patentes nacionais (IPNI, 2008) e internacionais (LATIPAT, 2011; EUROPEAN PATENT OFFICE, 2011) encontradas estão citadas na Figura 8.

Figura 8 – Patentes solicitadas para a espécie vegetal *Caesalpinia ferrea*

No Brasil – INPI		
Registro	Data	Título
PI0705224-3 A2	28/09/2007	Uso do extrato de pau ferro (<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.) em formulações cosméticas e farmacêuticas como agente despigmentante/clareador da pele
PI0506067-2 A2	15/04/2005	Valor nutricional do pau-ferro (<i>Caesalpinia ferrea</i> , Mart) como fonte de sulfato ferroso para suplementação alimentar e combate a anemia humana e animal
Países Ibero-americanos – Latipat		
Registro	Data	Título
BRPI0705224 (A2)	11/11/2009	Uso do extrato de pau ferro (<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.) em formulações cosméticas e farmacêuticas como agente despigmentante/clareador da pele
BRPI0506067 (A)	12/12/2006	Valor nutricional do pau-ferro (<i>Caesalpinia ferrea</i> , Mart) como fonte de sulfato ferroso para suplementação alimentar e combate a anemia humana e animal
Escritório Europeu - European Patent Office		
Registro	Data	Título
JP2006342078 (A)	21/12/2006	Agente para prevenir e tratar alergias

Fonte: European Patent Office. 2011 [acesso em 06 de janeiro 2015]. Disponível em:

www.european-ip-attorneys.org.

IPNI. The Internacional Plant Name Index. 2008 [acesso em 06 de janeiro 2015]. Disponível em: <http://www.ipni.org/ipni/pantnamesearchpage.do>.

Latipat. 2011 [acesso em 06 de janeiro de 2015]. Disponível em: lp.espacenet.com/.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar ensaios pré-clínicos da exposição materna à *Caesalpinia ferrea* a fim de estudar os efeitos dos extratos hidroalcoólicos secos reconstituídos de cascas e sementes da *Caesalpinia ferrea* Mart. na evolução da gestação de ratas.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a capacidade reprodutiva de ratas.

Avaliar a toxicidade materna por meio de análises bioquímicas, hematológicas e de biomarcadores de estresse oxidativo.

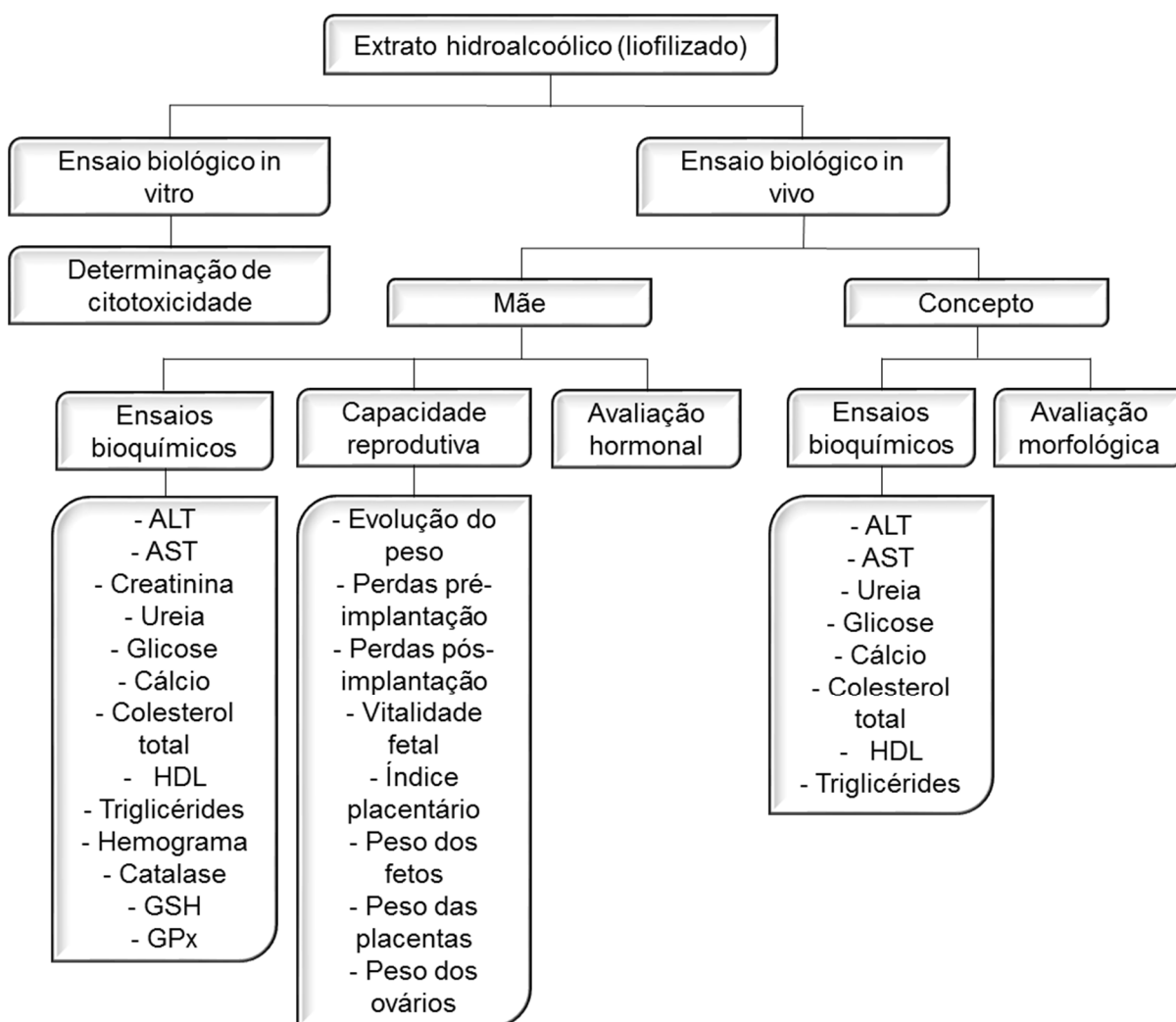
Avaliar a toxicidade fetal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O presente estudo foi desenhado na forma de um projeto principal, envolvendo iniciação científica e mestrado. O fluxograma (Figura 9) apresenta seu delineamento experimental, detalhando as etapas realizadas neste trabalho.

Figura 9 – Fluxograma do estudo



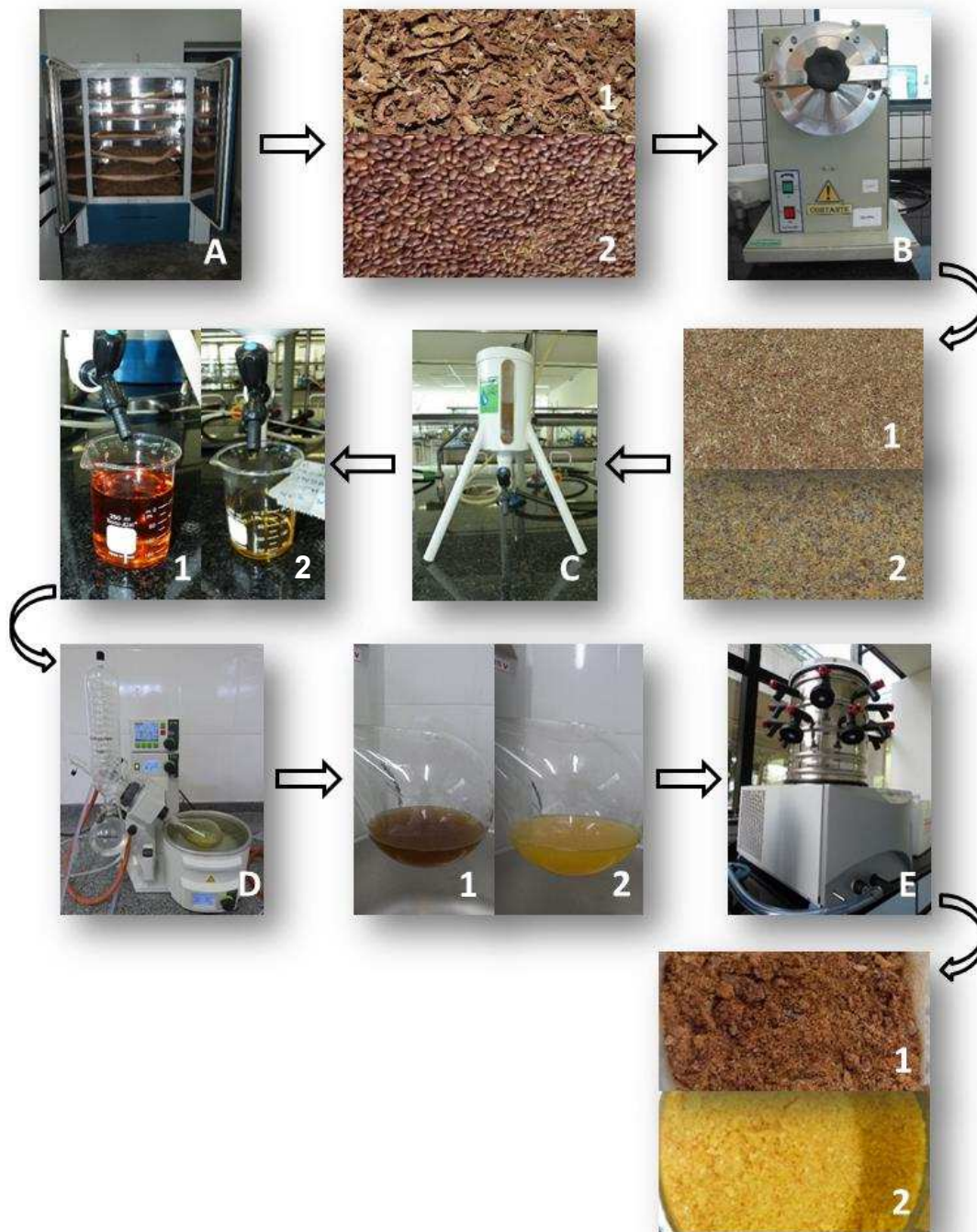
Fonte: Elaboração própria.

4.2 Material vegetal e obtenção do extrato

A *Caesalpinia ferrea* Martius foi coletada no Estado do Rio Grande do Norte, identificada e catalogada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), sob o número 12181 (ANEXO A). As cascas do caule da *Caesalpinia ferrea* Mart. foram obtidas por raspagem, e as sementes foram coletadas da vagem seca. Ambas foram devidamente acondicionadas em sacos plásticos, mantidas sob refrigeração, e transportadas até a Universidade de Sorocaba.

As cascas e sementes foram secas em estufa (Marconi® – MA035) com circulação e renovação de ar quente (40°C), durante 72 horas. O material vegetal seco foi pesado e sua massa registrada foi de 530 g de cascas e 960 g de sementes. Posteriormente, o material vegetal seco foi submetido à moagem em moinho de facas e martelos (Marconi® - MA340 Série 0004201) para obtenção de um pó fino. Seguiu-se, então, ao método de extração por percolação simples (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2002). Na percolação, a droga vegetal moída foi colocada em um recipiente cônico (percolador), através do qual se passou como líquido extrator o etanol 70%, a 30 gotas por minuto, até o esgotamento do pó da droga, obtendo-se 19,5 L de extrato percolado das cascas e 11,8 L de extrato percolado das sementes. O material percolado foi mantido refrigerado até o momento da concentração em rotaevaporador (Sistema de Rotaevaporação Büchi® R-215, Bomba de Vácuo V-700 e Chiller F-108), para que o álcool fosse eliminado, onde resultou em 5,9 L de extrato concentrado das cascas e 3,5 L de extrato concentrado de sementes. Posteriormente, o concentrado foi liofilizado (Liofilizador Thermo Fisher Scientific, SNL216V-115) a fim de retirar toda umidade, obtendo-se o extrato liofilizado (Figura 10).

Figura 10 – Preparação do extrato hidroalcoólico seco reconstituído da *Caesalpinia ferrea*



Nota: A: Secagem. B: Moagem. C: Percolação. D: Rotaevaporação. E: Liofilização. 1: Cascas.
2: Sementes.

Fonte: Elaboração própria.

4.3 Animais

Ratos Wistar (machos pesando entre 250 e 300 g e fêmeas pesando entre 180 e 200 g) com sete semanas de idade, foram adquiridos da Anilab - Animais de Laboratório, Paulínia, São Paulo, Brasil (Certificado de Procedência - ANEXO B; e Atestado de Saúde - ANEXO C).

Os animais foram alojados e ambientados em isoladores micro ambientais Alesco® (Figura 11) com troca e renovação de ar, no Biotério de Experimentação Animal do Laboratório de Pesquisa Toxicológica da Universidade de Sorocaba, pelo período de uma semana. A temperatura (22 ± 2 °C) e o ciclo claro/escuro (12 horas) foram controlados automaticamente. Os animais receberam ração da marca Purina® e água filtrada, *ad libitum*.

Para experimentação, as fêmeas prenhes foram divididas em três grupos de cinco animais.

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Sorocaba – CEUA/UNISO, São Paulo, sendo aprovado com o protocolo 0001/2012 (ANEXO D).

Figura 11 – Isoladores micro ambientais Alesco®



Fonte: Elaboração própria.

4.4 Avaliação da evolução da gestação de ratas

4.4.1 Acasalamento

Para o acasalamento, alojou-se, no máximo, 02 machos com 05 fêmeas por um período noturno de 12 horas. Por meio de observações microscópicas (Microscópio Biológico, Modelo Axio Lab.A1, ZEISS®), a indicativa do primeiro dia da prenhez foi a presença ou não de espermatozoides no esfregaço proveniente do lavado vaginal realizado com solução fisiológica a 0,9% (Figura 12) (GERENUTTI; FIOL; GROPPPO, 2006).

Figura 12 – Espermatozoides no lavado vaginal: Indicativo do primeiro dia de gestação



Fonte: Elaboração própria.

4.4.2 Prenhez e exposição à droga vegetal

Após a confirmação da prenhez, foi realizada uma divisão randomizada dos grupos, onde as ratas foram divididas em três grupos de cinco animais, alojadas individualmente e expostas aos tratamentos, diariamente. O grupo controle (GC) recebeu solução salina (0,9%) e os grupos experimentais receberam o extrato

hidroalcoólico seco reconstituído da casca da *Caesalpinia ferrea* Mart. (1,0 g/Kg reconstituído em solução salina a 0,9% - GCas) ou o extrato hidroalcoólico seco reconstituído da semente da *Caesalpinia ferrea* Mart. (1,0 g/Kg também reconstituído em solução salina a 0,9% - GSem).

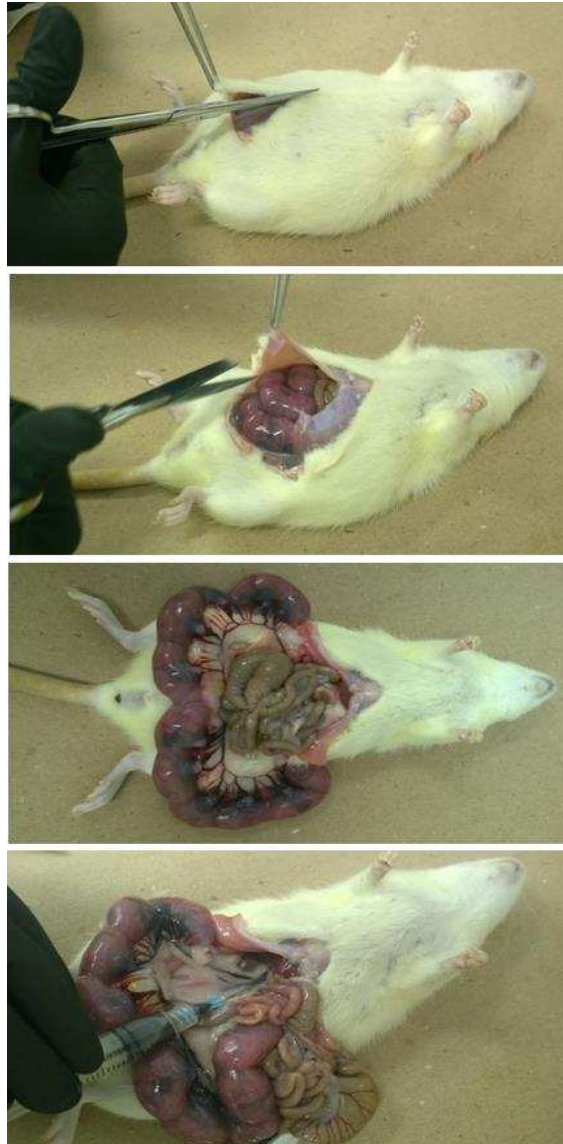
A escolha das doses administradas foi feita a partir de testes de solubilização do pó liofilizado em diferentes concentrações, sendo a dose mais alta solubilizada em 10 mL de solução salina a dose de escolha.

A administração diária da droga foi realizada por via oral (gavagem), do primeiro ao décimo nono dia de prenhez, sempre às quatorze horas. A água e a comida foram fornecidas *ad libitum* durante todo experimento. O peso dos animais foi acompanhado diariamente como descrito por Gerenutti et al. (2008).

4.4.3 Procedimento de cesárea e coleta de sangue materno

No vigésimo dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas por via intraperitoneal com a associação de xilasina (Anasedan®; 6 mg/kg) e quetamina (Dopalen®; 100 mg/kg). O procedimento de cesárea foi realizado pela incisão longitudinal na linha alba para exposição do útero e dos ovários e coleta de sangue (Figura 13).

Figura 13 – Procedimento de cesárea realizada ao 20º dia de prenhez



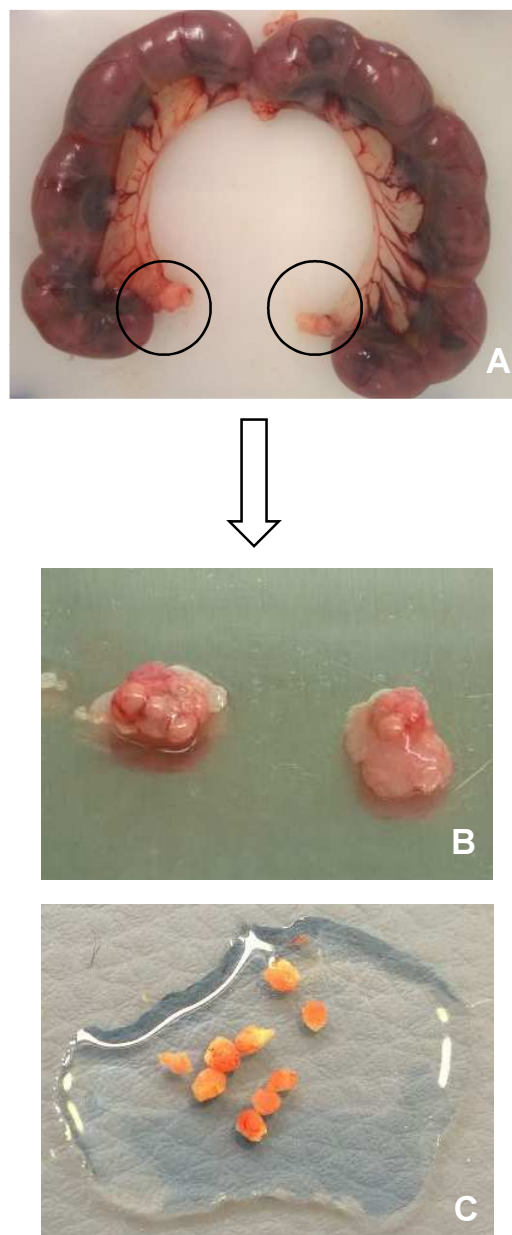
Fonte: Elaboração própria.

O sangue foi coletado por punção venosa hepática (em seringa previamente heparinizada) e foi imediatamente transferido para dois tubos: (tubo A) contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e (tubo B) sem o anticoagulante e com gel separador.

4.4.4 Avaliação da capacidade reprodutiva, toxicidade materna e toxicidade fetal

Para a avaliação da capacidade reprodutiva o útero e os ovários foram retirados. Os ovários foram separados do útero para pesagem e contagem de corpos lúteos (Figura 14). Após a realização do procedimento de cesárea as ratas foram sacrificadas por aprofundamento anestésico, seguido de perfuração do diafragma.

Figura 14 – Retirada de ovários e contagem de corpos lúteos



Fonte: Elaboração própria.

Nota: A: Inspeção do útero. B: Retirada dos ovários. C: Retirada e contagem de corpos lúteos.

A toxicidade materna foi avaliada utilizando-se as análises bioquímicas dos parâmetros de ALT, AST, creatinina, ureia, cálcio, glicose, triglicérides, colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), realizadas no equipamento Cobas C111 (Roche®); do índices hematimétricos determinados através de hemograma completo realizado no equipamento XS-1000i (Roche®) e das determinações espectrofotometrias (PerkinElmer®, Lambda 35) de parâmetros de estresse oxidativo: glutathiona reduzida (GSH), catalase e glutathiona peroxidase (GPx).

Em seguida, o útero foi inspecionado quanto ao número de fetos, número de implantações e número de reabsorções visíveis. Os cornos uterinos foram seccionados para a retirada dos sacos gestacionais (Figura 15).

Figura 15 – Retirada de fetos sem rompimento do saco gestacional



Fonte: Elaboração própria.

O líquido amniótico foi coletado do saco gestacional, antes de ser rompido para a retirada do feto e da placenta (Figura 16).

Figura 16 – Coleta de líquido amniótico do interior do saco gestacional de fetos de ratas



Fonte: Elaboração própria.

A vitalidade fetal foi verificada, os fetos, as placentas e os ovários foram pesados em balança (Shimadzu® - AUW220D). Após pesados, os fetos foram sacrificados em cuba com halotano.

Para avaliar a capacidade reprodutiva as perdas pré-implantação, perdas pós-implantação, vitalidade fetal e índice placentário foram utilizadas as equações:

Equação 1:

$$\% \text{ Perdas Pré-implantação} = \frac{\text{nº de corpos lúteos} - \text{nº de implantações}}{\text{nº de corpos lúteos}} \times 100$$

Equação 2:

$$\% \text{ Perdas Pós-implantação} = \frac{\text{nº de implantações} - \text{nº de fetos vivos}}{\text{nº de implantações}} \times 100$$

Equação 3:

$$\% \text{ Vitalidade fetal} = \frac{\text{nº de fetos vivos}}{\text{nº de total de fetos}} \times 100$$

Equação 4:

$$\text{Índice placentário} = \frac{\text{mediana do peso placentário}}{\text{mediana do peso fetal}}$$

4.4.4.1 Processamento de material para análise de toxicidade

Todo o material biológico, sangue, placenta ou líquido amniótico, utilizado na avaliação da toxicidade da *Caesalpinia ferrea* foi processado separadamente, de acordo com as análises específicas a serem realizadas. As amostras foram armazenadas em biofreezer a -80 °C (REVCO® ULT-1386-3-D) até o momento da análise, exceto o sangue utilizado para realização do hemograma.

De modo geral, para a avaliação bioquímica foram considerados os seguintes parâmetros: função renal, função hepática, níveis de glicose, avaliação lipídica, dosagens de eletrólitos e estresse oxidativo.

- **Sangue materno**

Uma alíquota de 500 µL do sangue total, coletado das ratas durante o procedimento de cesárea, foi transferida do tubo de coleta A para um tubo tipo Eppendorf®, para posterior análise de glutathione reduzida (GSH), catalase e glutathione peroxidase (GPx).

O sangue restante foi imediatamente utilizado para realização de hemograma completo no Analisador Hematológico XS-1000i da Sysmex®.

O sangue do tubo de coleta B foi centrifugado em centrífuga refrigerada (SORVALL® ST 16R) por 10 minutos a 3000 rpm e 22 °C e armazenado em tubo tipo Eppendorf, para posterior análise dos marcadores ALT, AST, creatinina, ureia, cálcio, glicose, triglicérides, colesterol total e HDL.

- **Líquido amniótico**

Um *pool* de líquido amniótico dos sacos gestacionais foi transferido para um tubo tipo Eppendorf. O processamento das amostras foi feito através de uma adaptação do método utilizado por Zogno, Miglino e Oliveira (2004). No momento da análise, as amostras de líquido amniótico foram descongeladas e centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm e 22 °C, o sobrenadante foi coletado e utilizado para realização das análises de ureia, ALT, AST, glicose, cálcio e HDL.

- **Placenta**

Para a realização das análises bioquímicas foram escolhidas aleatoriamente três placentas por mãe, pesou-se 250 mg do *pool* das três placentas e adicionou-se 5 mL de cloreto de potássio a 1,15%. As placentas foram sonicadas com auxílio de processador ultrassônico (Sonics® VCX 130 PB) por dois ciclos de 30 segundos com 35% de amplificação. Após o processamento, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm a 22 °C e o sobrenadante coletado para posterior análise de ALT, AST, glicose, cálcio, triglicérides, colesterol e HDL.

4.4.4.2 Análises bioquímicas automatizadas

As dosagens bioquímicas automatizadas foram realizadas no equipamento Cobas C111 (Roche®), que utiliza como princípio de medição a fotometria de absorbância. O Cobas C111 foi desenvolvido para laboratórios de pequeno porte, possui um rendimento de 60 a 85 testes/hora, apresenta como princípio de medição a fotometria de absorbância, utiliza doze comprimentos de onda e realiza medição monocromática e bicromática.

Para as análises, o equipamento foi calibrado com os reagentes C.f.a.s. (Calibrator for automated systems, Roche®) ou o C.f.a.s. Lipides.

O C.f.a.s. ou o C.f.a.s. Lipides são utilizados para realizar a calibração dos reagentes; o controle de qualidade para a monitorização da exatidão e precisão dos métodos quantitativos foi realizado empregando-se, antes do início das análises, os reagentes Precinorm U plus ou Precinorm L.

Os reagentes dos kits foram inseridos no disco refrigerado próprio para reagentes; o segmento de cubetas foi inserido no anel interno; as amostras foram cadastradas no equipamento e o pedido foi definido. Foram colocados 300 uL de soro no cup de amostra e o mesmo foi inserido na área de amostras, que tem capacidade de oito amostras por vez. O equipamento verifica a qualidade da cubeta, pipeta os reagentes e as amostras, incuba e inicia as medições. Os resultados foram calculados pelo equipamento com base nos resultados de medição fotométrica que determinaram a quantidade de absorbância no fluido.

- ***Avaliação da toxicidade hepática***

O teste de ALTL tem como princípio a catalização da reação entre L-alanina e 2-oxoglutarato. O piruvato formado é reduzido por nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto (NADH) numa reação catalisada por lactato desidrogenase (LDH), formando L-lactato e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). O AST na amostra catalisa a transferência de um grupo amino entre L-aspartato e 2-oxoglutarato, formando oxaloacetato e L-glutamato. O oxaloacetato reage então com NADH, na presença de malato desidrogenase (MDH), formando NAD⁺. A taxa de oxidação de NADH é diretamente proporcional às atividades catalíticas de ALT e AST, determinada medindo a diminuição da absorbância. Ambos os testes possuem um intervalo de medição de 200-700 U/L e o comprimento de onda utilizado é de 340/378 nm (ROCHE).

- ***Avaliação da toxicidade renal***

O teste de CREJ2 baseia-se no método de Jaffé, através de um ensaio colorimétrico cinético. Numa solução alcalina a creatinina forma um complexo amarelo avermelhado com picrato. A taxa de formação do corante é proporcional à concentração de creatinina na amostra. O intervalo de medição do teste é de 0,2-12,4 mg/dL e o comprimento de onda é de 512/583 nm.

O princípio do teste UREAL é cinético e baseia-se em duas reações. Primeiramente a ureia é hidrolisada pela urease, dando origem a amônia e carbonato. Na segunda reação, o 2-oxoglutarato reage com amônia na presença de glutamato desidrogenase (GLDH) e da coenzima NADH, dando origem a L-glutamato. O NADH é oxidado a NAD, a taxa de diminuição da concentração de NADH é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra. O teste possui um intervalo de medição de 3,0-240 mg/dL e utiliza como comprimento de onda 340/409 nm.

- ***Avaliação de distúrbio eletrolítico***

No teste CA2 os íons de cálcio, em condições alcalinas, reagem com 5-nitro-5'-metil-BAPTA (NM-BAPTA) e formam um complexo, que reage na segunda etapa

com EDTA. A alteração da absorvância é diretamente proporcional à concentração de cálcio. O intervalo de medição do teste é de 0,20-5,0 mmol/L (0,8-20,1 mg/dL) e o comprimento de onda é de 340/378 nm.

- ***Avaliação de glicemia***

O teste de glicose - GLUC2, utiliza um método enzimático de referência com hexoquinase. A hexoquinase catalisa a fosforilação da glucose em glucose-6-fosfato por ATP. Na presença de NADP, a glucose-6-fosfato-desidrogenase oxida a glucose-6-fosfato em gluconato-6-fosfato, sendo que nenhum outro hidrato de carbono é oxidado. A concentração de glucose vai ser diretamente proporcional à taxa de formação de NADPH. Para esse teste o intervalo de medição é de 0,11-40 mmol/L (1,98-720 mg/dL) e o comprimento de onda utilizado é de 340/409 nm.

- ***Avaliação do metabolismo lipídico***

O teste TRIGL é um teste colorimétrico enzimático. O método utiliza uma lipoproteína lipase de microrganismos para a hidrólise rápida e completa dos triglicerídeos para glicerol, seguida de oxidação para fosfato de dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio produzido reage depois com a 4-aminofenazona e 4-clorofenol sob a ação catalítica da peroxidase, para formar um corante vermelho (reação de ponto final de Trinder). A intensidade do corante vermelho formado é diretamente proporcional à concentração de triglicérides, podendo ser medida fotometricamente, utilizando comprimento de onda de 512/659 nm. O teste possui um intervalo de medição de 0,1-10 mmol/L (8,85-885 mg/dL).

O colesterol (CHOL2) é quantificado através de um método colorimétrico enzimático. Os ésteres de colesterol são clivados através da ação da colesterol esterase e produzem colesterol livre e ácidos graxos. A colesterol oxidase catalisa a oxidação do colesterol para colest-4-em-3-ona e peróxido de hidrogênio. Em presença da peroxidase, o peróxido de hidrogênio formado afeta o acoplamento oxidativo do fenol e da 4-aminoantipirina, formando um corante vermelho de quinona-imina. A intensidade da cor do corante formado é diretamente proporcional à concentração de

colesterol. O intervalo de medição do teste é de 0,25-20,7 mmol/L (9,7-800 mg/dL) e o comprimento de onda utilizado 512/659 nm.

O HDLC3 é um teste colorimétrico enzimático homogêneo. Na presença de íons de magnésio, o sulfato de dextrano forma seletivamente complexos hidrossolúveis com LDL, VLDL e quilomícrons que são resistentes às enzimas modificadas por PEG. A concentração do colesterol HDL é determinada enzimaticamente pela colesterol esterase e colesterol oxidase acopladas com PEG aos grupos amino (cerca de 40%). Sob a influência da colesterol esterase, os ésteres de colesterol são quantitativamente decompostos em colesterol livre e ácidos graxos. Na presença de oxigênio, o colesterol é oxidado pela colesterol oxidase a Δ^4 -coletenona e peróxido de hidrogênio. Na presença da peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio gerado reage com a 4-aminoantipirina e a sodium N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina para formar um corante púrpuro-azulado. A intensidade da cor do complexo púrpura formado é diretamente proporcional à concentração de colesterol HDL e é medida fotometricamente em 583/659 nm. O intervalo de medição é de 0,08-3,12 mmol/L (3-120 mg/dL).

4.4.4.3 Avaliação de estresse oxidativo

Para os parâmetros de estresse oxidativo foram determinadas as concentrações dos marcadores GSH e catalase, a partir do sangue total coletado, em espectrofotômetro (PerkinElmer®, Lambda 35).

A determinação de GSH foi realizada através do método de Ellman (1959) e o resultado foi obtido através da equação da reta da curva de calibração. Para as análises das amostras de sangue, pipetou-se 150 μ L de sangue das ratas prenhes e adicionou-se 100 μ L de triton X-100 à 10% para hemólise do sangue. Após, adicionou-se 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 30%, utilizado para acidificar o meio e para quebra das proteínas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm em centrífuga refrigerada (SORVALL® ST 16R) a 4°C e o sobrenadante coletado. Para a leitura, 50 μ L do sobrenadante foi diluído em 900 μ L de tampão fosfato de potássio (pH 7,4) e em 50 μ L de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 10 mM, responsável pela formação de um complexo amarelado. As amostras

foram lidas em 412 nm no espectrofotômetro (PerkinElmer®, Lambda 35). Os resultados foram expressos em mM. Durante todo o procedimento as amostras foram conservadas em banho de gelo.

A atividade da enzima catalase foi determinada utilizando o método de Aebi (1984). Para isso, foi diluído 10 µL de sangue em 590 µL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e a solução mantida em gelo durante todo o período de análise. Após, 20 µL do sangue diluído foi adicionado em 1910 µL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e 70 µL de peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada em 240 nm e o decaimento na absorbância, sinal da atividade da enzima, foi acompanhado durante cinco minutos em espectrofotômetro (PerkinElmer®, Lambda 35). Os valores de hemoglobina (g/L), determinados no equipamento XS 1000i, foram utilizados para calcular, junto com a constante de Aebi (k), os valores de atividade da catalase, expressos em k/g Hb.

Para dosagem da atividade da enzima GPx foi preparado um sistema tamponado composto de NADPH, glutathiona reduzida e glutathiona redutase. As análises foram realizadas através do método de Paglia e Valentine (1967). As amostras e reagentes foram mantidos em banho de gelo durante toda a análise. As amostras foram previamente diluídas na proporção 1:40 (10 µL de sangue mais 390 µL de tampão fosfato de potássio com EDTA pH 7,0). Adicionou-se 20 µL de amostra pré-diluída em 880 µL de sistema e 100 µL de peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada em 340 nm em um intervalo de dois minutos em espectrofotômetro (PerkinElmer®, Lambda 35), onde o decaimento na absorbância, sinal da atividade da enzima, foi acompanhado. O resultado foi expresso em nmol Nad/min/mL de sangue.

4.5 Análise Estatística

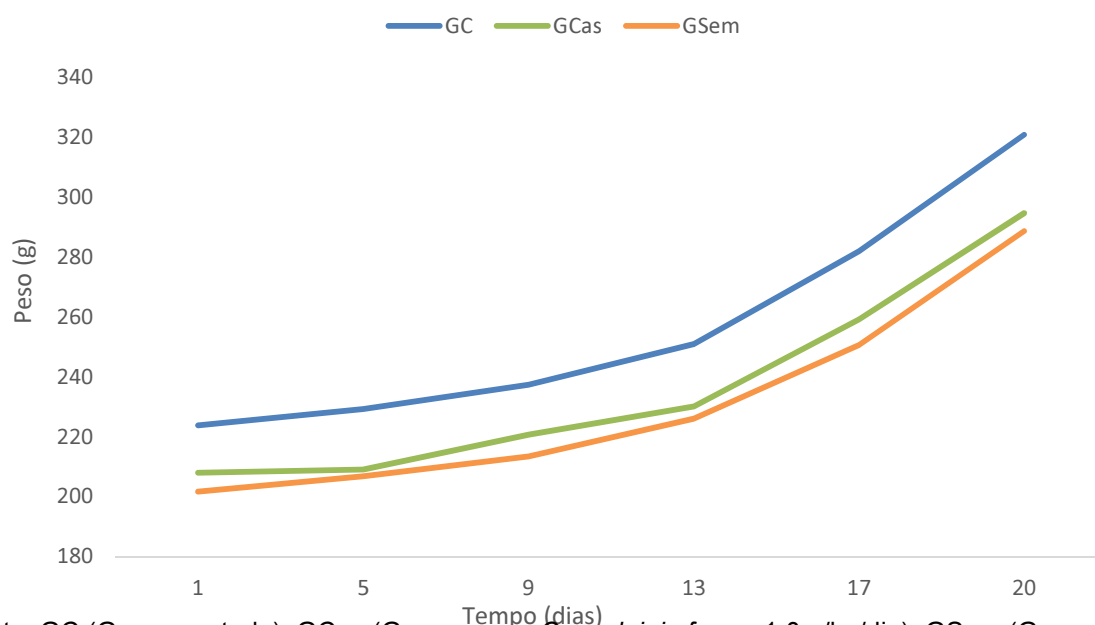
Para análise dos resultados foi utilizado o nível de significância entre 1 e 5%. A análise de variância Anova foi utilizada para os dados paramétricos, seguida do teste Tuckey-Kramer (Peso dos fetos, peso das placentas, peso dos ovários, índice placentário, hemograma, ALT, AST, creatinina, ureia, glicose, cálcio, colesterol total, triglicérides e HDL) ou teste de Duncan (Catalase, GSH e GPx) para comparações múltiplas em todos os experimentos realizados. Foi utilizado também o teste de Qui Quadrado (Perdas pré-implantação, perdas pós-implantação e vitalidade fetal).

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos da exposição à *Caesalpinia ferrea* sobre a capacidade reprodutiva

A evolução do peso das ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de *Caesalpinia ferrea* mostra semelhança ao grupo controle (Figura 17). Os grupos apresentaram um pequeno ganho de peso do 1º ao 5º dia de prenhez, o que se elevou do 5º ao 13º dia, apresentando um aumento no ganho de peso ainda mais considerável do 13º ao 20º dia.

Figura 17 – Evolução de peso de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de *Caesalpinia ferrea* durante o período de gestação



Nota: GC (Grupo controle), GCas (Grupo casca *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia), GSem (Grupo semente *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia).

Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 1 mostra os resultados da performance reprodutiva das ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes da *Caesalpinia ferrea* durante o período de gestação. Os parâmetros analisados foram: perdas pré-implantação (equação 1), perdas pós-implantação (equação 2), vitalidade fetal (equação 3), índice placentário (equação 4), peso dos fetos, peso das placentas e peso dos ovários.

Tabela 1 – Performance reprodutiva de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de *Caesalpinia ferrea* durante o período de gestação

Parâmetros	Grupos		
	GC	GCas	GSem
Perdas pré-implantação (%)	1,54	5,66	1,82
Perdas pós-implantação (%)	6,25	10,00	3,70
Vitalidade fetal (%)	100	97,83	98,11
Índice placentário	0,191 ± 0,019	0,179 ± 0,010	0,191 ± 0,019
Peso dos fetos (g)	2,468 ± 0,307	2,471 ± 0,203	2,552 ± 0,329
Peso das placentas (g)	0,521 ± 0,097	0,456 ± 0,082*	0,490 ± 0,095
Peso dos ovários (g)	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,01

Nota: GC (Grupo controle), GCas (Grupo casca *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia), GSem (Grupo semente *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia). N= 05 animais. *Comparação ao grupo controle ($p \leq 0,05$, Teste de Qui Quadrado e ANOVA seguido de Teste de Tuckey-Kramer múltiplas comparações).

Fonte: Elaboração própria.

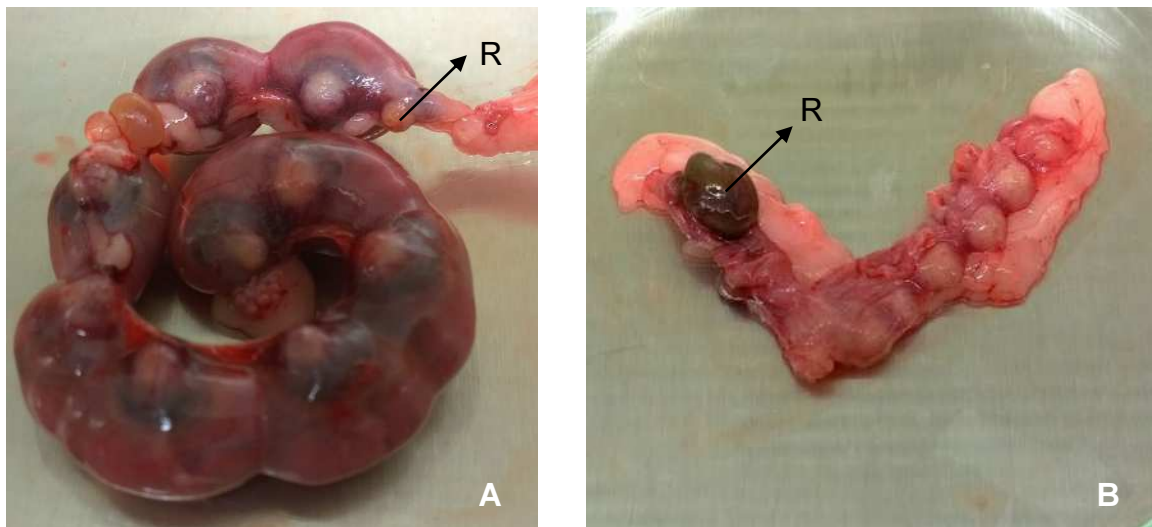
Para o cálculo do percentil de perdas pré-implantação foram utilizados os resultados de número de corpos lúteos por grupo (GC= 65, GCas= 53 e GSem=55) e número de implantações por grupo (GC= 64, GCas= 50 e GSem=54) e utilizada a equação 1.

As perdas pós-implantação foram calculadas através da equação 2 utilizando o resultado do número de implantações por grupo (GC= 64, GCas= 50 e GSem=54)

e número de fetos vivos por grupo (GC= 60, GCas= 45 e GSem=52) e representam as reabsorções (Figura 18) e o nascimento de fetos mortos (Figura 19).

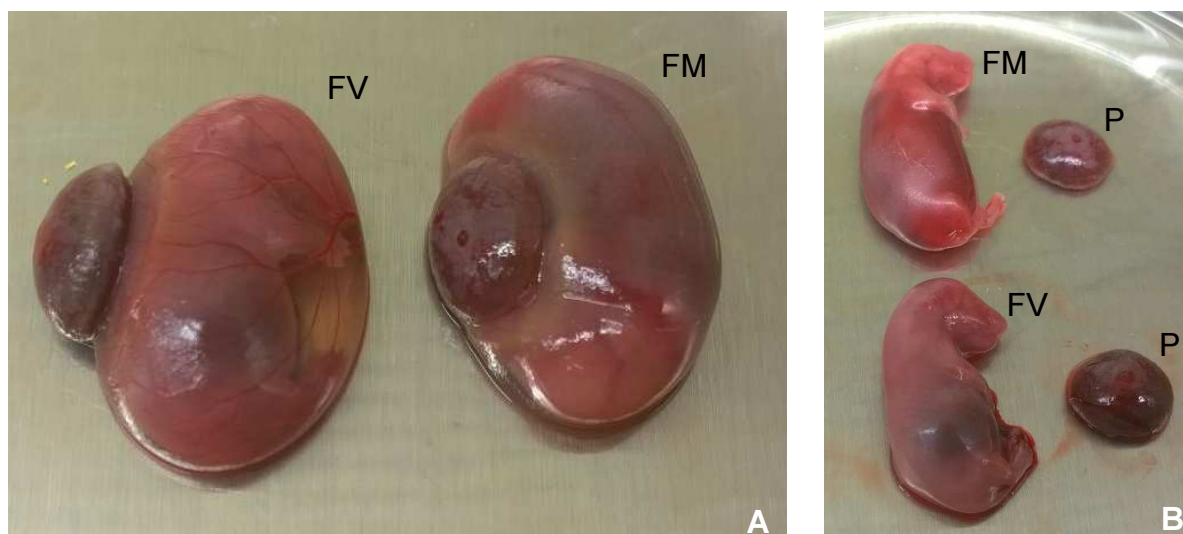
O percentual de vitalidade fetal, calculado através da equação 3, levou em conta o resultado do número de fetos vivos por grupo (GC= 60, GCas= 45 e GSem=52) e o número total de fetos por grupo (GC= 60, GCas= 46 e GSem=53). O índice placentário foi calculado com base nos resultados do peso das placentas e no peso dos fetos, utilizando a equação 4.

Figura 18 – Útero de rata com reabsorção fetal



Nota: R: Ponto de reabsorção fetal. A: útero com os fetos. B: útero sem os fetos.
Fonte: Elaboração própria.

Figura 19 – Avaliação de vitalidade fetal



Nota: FV: Feto vivo. FM: Feto morto. P: Placenta. A: Envolto em saco gestacional. B: Após retirada do saco gestacional.

Fonte: Elaboração própria.

O peso das placentas do grupo tratado com o extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas apresentou uma diminuição significativa em relação ao peso das placentas do grupo controle ($F = 6,072$, $p < 0,01$). Não houve alteração significativa nos outros parâmetros estudados.

5.2 Efeitos da exposição à *Caesalpinia ferrea* sobre a toxicidade materna

A Tabela 2 mostra as dosagens bioquímicas ALT, AST, creatinina, ureia, glicose, cálcio, colesterol total, HDL e triglicérides realizada no soro das ratas. Os resultados indicam que houve um aumento dos níveis de creatinina no grupo tratado com semente em relação ao grupo controle ($F = 3,996$, $p < 0,05$).

Tabela 2 – Análise bioquímica materna realizada em soro de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de *Caesalpinia ferrea* durante o período de gestação

Parâmetros	Grupos		
	GC	GCas	GSem
ALT (U/L)	67,92 ± 16,95	78,35 ± 14,11	61,08 ± 12,09
AST (U/L)	72,54 ± 26,9	76,50 ± 24,75	70,78 ± 32,92
Creatinina (mg/dL)	0,18 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,25 ± 0,05*
Ureia (mg/dL)	42,83 ± 4,24	44,46 ± 5,93	49,88 ± 8,09
Glicose (mg/dL)	146,88 ± 13,78	158,01 ± 8,11	131,48 ± 9,74
Cálcio (mmol/L)	2,17 ± 0,07	2,35 ± 0,10	2,32 ± 0,31
Colesterol total (mg/dL)	73,65 ± 10,77	73,56 ± 11,55	77,27 ± 10,74
HDL (mg/dL)	26,12 ± 10,39	15,26 ± 7,88	28,23 ± 4,70
Triglicérides (mg/dL)	270,21 ± 108,01	378,57 ± 187,02	299,58 ± 147,53

Nota: GC (Grupo controle), GCas (Grupo casca *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia), GSem (Grupo semente *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia). ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), HDL (Lipoproteínas de alta densidade). N= 05 animais; *Comparação ao grupo controle ($p \leq 0,05$, ANOVA, Teste de Tuckey-Kramer múltiplas comparações).

Fonte: Elaboração própria.

Os índices hematimétricos estão apresentados na Tabela 3 e representam os valores de hemácia, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina de corpuscular média (CHCM), plaqueta, leucócito, linfócito, monócito e eosinófilo.

O grupo tratado com sementes apresentou uma diminuição na contagem de plaquetas, quando comparado ao grupo controle ($F = 15,141$, $p < 0,01$).

A série branca apresentou alteração na contagem de eosinófilos, sendo que o grupo tratado com o extrato hidroalcoólico seco reconstituído das sementes teve um aumento em relação ao grupo controle ($F = 6,462$, $p < 0,05$).

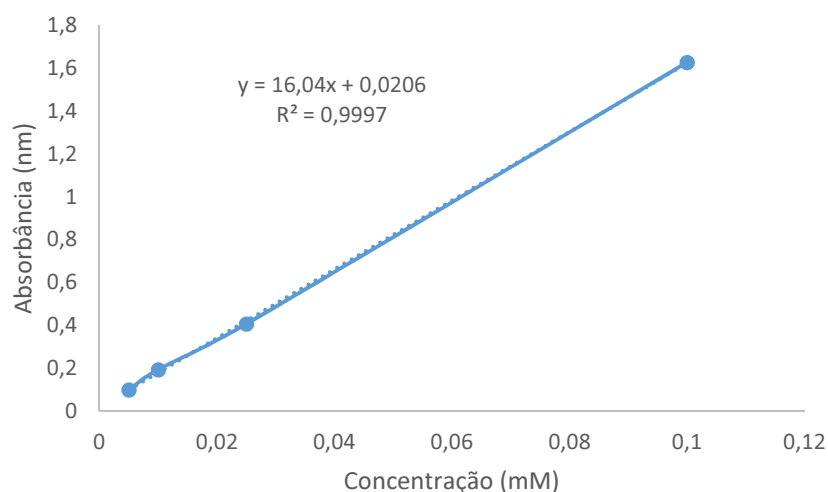
Tabela 3 – Índices hematimétricos de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de *Caesalpinia ferrea* durante o período de gestação

Parâmetros	Grupos		
	GC	GCas	GSem
Hemácia ($10^6/\mu\text{L}$)	5,33 $\pm$ 0,18	5,46 $\pm$ 0,15	5,04 $\pm$ 0,62
Hemoglobina (g/dL)	10,16 $\pm$ 0,46	10,54 $\pm$ 0,34	10,00 $\pm$ 1,34
Hematócrito (%)	32,80 $\pm$ 1,61	34,02 $\pm$ 0,90	31,90 $\pm$ 4,04
VCM (fL)	61,52 $\pm$ 2,20	62,30 $\pm$ 1,54	63,24 $\pm$ 1,11
HCM (pg)	19,06 $\pm$ 0,61	19,28 $\pm$ 0,41	19,82 $\pm$ 0,66
CHCM (g/dL)	30,98 $\pm$ 0,34	30,96 $\pm$ 0,32	31,32 $\pm$ 0,65
Plaqueta ($10^3/\mu\text{L}$)	729,25 $\pm$ 105,43	814,67 $\pm$ 117,73	490,33 $\pm$ 125,03*
Leucócito ($10^3/\mu\text{L}$)	6,59 $\pm$ 0,85	7,31 $\pm$ 2,17	8,66 $\pm$ 3,37
Linfócito ($10^3/\mu\text{L}$)	4,24 $\pm$ 0,62	5,28 $\pm$ 2,08	5,55 $\pm$ 1,80
Monócito ($10^3/\mu\text{L}$)	0,42 $\pm$ 0,15	0,62 $\pm$ 0,19	0,50 $\pm$ 0,06
Eosinófilo ($10^3/\mu\text{L}$)	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,01*

Nota: GC (Grupo controle), GCas (Grupo casca *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia), GSem (Grupo semente *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia). VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média). N= 05 animais; *Comparação ao grupo controle ($p \leq 0,05$, ANOVA, Teste de Tuckey-Kramer múltiplas comparações).

Fonte: Elaboração própria.

Para os parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados a atividade da enzima catalase, a concentração de GSH e a atividade da enzima GPx. Para o cálculo da concentração de GSH foi construída uma curva padrão (Figura 20). Os resultados estão indicados na Tabela 4 e demonstram que não houve alteração estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 20 – Curva padrão utilizada para cálculo de concentração da GSH

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 – Parâmetros de estresse oxidativo em sangue de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de *Caesalpinia ferrea* durante o período de gestação

Parâmetros	Grupos		
	GC	GCas	GSem
Catalase	8,895 ± 2,466	8,925 ± 1,521	12,014 ± 3,164
GSH	0,466 ± 0,068	0,554 ± 0,148	0,574 ± 0,113
GPx	31,651 ± 14,54	23,47 ± 7,531	25,977 ± 8,388

Nota: GC (Grupo controle), GCas (Grupo casca *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia), GSem (Grupo semente *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia). GSH (glutathiona reduzida), GPx (glutathiona peroxidase). N= 05 animais (p>0,05, ANOVA, Teste de Duncan múltiplas comparações).

Fonte: Elaboração própria.

5.3 Efeitos da exposição à *Caesalpinia ferrea* sobre a toxicidade fetal

A análise bioquímica fetal realizada no líquido amniótico dos fetos de ratas expostas à *Caesalpinia ferrea* está representada na Tabela 5. Os parâmetros creatinina, colesterol total e triglicérides foram avaliados, porém a leitura dos resultados foi menor que os níveis detectáveis pelos testes.

O grupo que recebeu o extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes da *Caesalpinia ferrea* apresentou um aumento na concentração de AST quando comparado ao grupo controle ($F= 3,93$, $p<0,05$).

Houve alteração significativa nos níveis de glicose, sendo que o grupo tratado com extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes ($F= 11,26$, $p<0,01$) e o grupo tratado com cascas ($F= 11,26$, $p<0,001$) apresentaram um aumento na concentração em relação ao grupo controle.

A dosagem de cálcio também mostrou alteração, sendo que o grupo que recebeu o extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes obteve uma diminuição nos níveis de cálcio se comparado ao grupo controle ($F= 6,095$, $p< 0,05$).

Tabela 5 – Análise bioquímica fetal realizada em líquido amniótico de fetos de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de *Caesalpinia ferrea* durante o período de gestação

Parâmetros	Grupos		
	GC	GCas	GSem
ALT (U/L)	1,19 ± 0,35	1,23 ± 0,44	1,49 ± 0,65
AST (U/L)	12,20 ± 1,38	14,93 ± 3,84	16,86 ± 5,02*
Ureia (mg/dL)	48,07 ± 2,76	48,58 ± 4,93	48,41 ± 5,18
Glicose (mg/dL)	36,75 ± 3,99	44,52 ± 1,81*	43,35 ± 5,24*
Cálcio (mmol/L)	2,34 ± 0,19	2,34 ± 0,10	2,10 ± 0,22*
HDL (mg/dL)	1,02 ± 0,35	0,89 ± 0,45	1,08 ± 0,30

Nota: GC (Grupo controle), GCas (Grupo casca *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia), GSem (Grupo semente *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia). ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), HDL (Lipoproteínas de alta densidade). N= 10 amostras. *Comparação ao grupo controle ($p<0,05$, ANOVA, Teste de Tuckey-Kramer múltiplas comparações).

Fonte: Elaboração própria.

Os resultados da análise bioquímica fetal realizada no *pool* de placentas dos fetos de ratas expostas à *Caesalpinia ferrea* encontra-se na Tabela 6. Embora a

dosagem de creatinina tenha sido realizada, o resultado apresentou uma leitura menor que o nível detectável pelo teste.

Houve uma alteração significativa nos níveis de triglicérides, onde o grupo que recebeu o extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas apresentou um aumento na concentração de triglicérides quando comparado ao grupo controle ($F=5,032$, $p<0,005$)

Tabela 6 – Análise bioquímica fetal realizada em placenta de fetos de ratas expostas ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de *Caesalpinia ferrea* durante o período de gestação

Parâmetros	Grupos		
	GC	GCas	GSem
ALT (U/L)	49,62 ± 7,43	53,54 ± 5,42	57,53 ± 11,02
AST (U/L)	832,72 ± 87,42	862,50 ± 84,61	763,60 ± 40,69
Ureia (mg/dL)	3,10 ± 0,34	3,00 ± 0,38	3,27 ± 0,25
Glicose (mg/dL)	6,29 ± 1,18	6,72 ± 0,68	7,03 ± 0,73
Cálcio (mmol/L)	0,11 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,07 ± 0,01
Colesterol total (mg/dL)	13,44 ± 0,57	13,78 ± 1,03	14,11 ± 1,54
HDL (mg/dL)	0,38 ± 0,20	0,32 ± 0,21	0,44 ± 0,16
Triglicérides (mg/dL)	12,7 ± 2,19	16,00 ± 2,48*	13,60 ± 2,53

Nota: GC (Grupo controle), GCas (Grupo casca *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia), GSem (Grupo semente *Caesalpinia ferrea* 1,0 g/kg/dia). ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), HDL (Lipoproteínas de alta densidade). N= 05 amostras. *Comparação ao grupo controle ($p\leq 0,05$, ANOVA, Teste de Tuckey-Kramer múltiplas comparações).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Os ensaios que envolvem avaliações bioquímicas em animais de laboratório são, muitas vezes, controversos. Neste sentido, Dantas e colaboradores (2006) ao estabelecerem valores de referência para seus animais, encontraram variações intraespécies comparando seus resultados com os apresentados na literatura e concluíram que os laboratórios ou biotérios devem ter estabelecido seus próprios valores de referência, levando em conta a idade, sexo, linhagem e dieta utilizados. Em nosso estudo a referência utilizada foi o GC.

A placenta possui como função primária atuar como uma interface entre a mãe e o feto em desenvolvimento, sendo um importante órgão em estudos de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento (FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014). Segundo Cotechini, Hopman e Graham (2014) alterações no tamanho e na forma da placenta podem evidenciar uma restrição no crescimento fetal. O grupo tratado com extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas apresentou um baixo peso de placenta quando comparado ao grupo controle, o que pode indicar uma toxicidade sobre o desenvolvimento dos fetos, embora não tenhamos encontrado diferença significativa no peso dos fetos ($2,468 \pm 0,307$ – GC, $2,471 \pm 0,203$ – GCas e $2,552 \pm 0,329$ – GSem) e no índice placentário ($0,191 \pm 0,019$ – GC, $0,179 \pm 0,010$ – GCas e $0,191 \pm 0,019$ – GSem).

Embora foram encontradas algumas alterações placentárias, os resultados obtidos indicaram que a *Caesalpinia ferrea*, nas doses estudadas, não promoveu alterações no ganho de peso das gestantes, nas perdas pré-implantações ou nas perdas pós-implantações, indicando que não interfere com a capacidade reprodutiva dos animais.

Apenas a avaliação da capacidade reprodutiva dos animais não garante a inexistência de toxicidade materna ou fetal. A utilização do sangue materno, da placenta e do líquido amniótico, para avaliações bioquímicas, foram fundamentais para a avaliação complementar da toxicidade da *Caesalpinia ferrea* sobre a reprodução. Os biomarcadores alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST, creatinina, ureia, cálcio, glicose, triglicérides, colesterol total, lipoproteínas de alta densidade - HDL, índices hematimétricos, dosagens de glutathione reduzida - GSH, catalase e glutathione peroxidase – GPx foram avaliados neste estudo.

A enzima AST é distribuída amplamente no organismo, principalmente nas células dos músculos cardíacos, músculo esquelético e fígado. Quando há lesão nas células desses tecidos, a AST é liberada, indicando lesão hepática, cardíaca ou de músculo esquelético (BUSH, 2004). De acordo com Fréjaville e Kamoun (1989), não há variações fisiológicas da AST durante a gravidez.

Neste estudo, obtivemos um aumento de AST no líquido amniótico no grupo exposto ao extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes em relação ao grupo controle e um aumento na concentração de triglicérides nas análises de placenta do grupo tratado com extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas em comparação ao grupo controle. No estudo de Vasconcelos e colaboradores (2011), houve uma diminuição significativa nos níveis de ureia, ácido úrico, AST e ALT, e um aumento nos níveis de colesterol total e triglicérides. Diferente de Vasconcelos e colaboradores (2011), não obtivemos alteração nas concentrações de ureia, ALT e colesterol total.

Kirbas e colaboradores (2014) realizaram um estudo com mulheres grávidas com colestase intra-hepática severa e relataram um aumento significativo na concentração de AST nessas mulheres em relação às mulheres gestantes saudáveis. No estudo de Asgharnia e colaboradores (2014), comparando gestantes saudáveis e gestantes com ruptura prematura de membrana, encontraram no fluído vaginal um aumento nos níveis de AST, concluindo ser este um importante marcador para o diagnóstico de ruptura prematura de membranas, quadro que está relacionado à grande porcentagem de partos prematuros.

Importante para o armazenamento de ácidos graxos, os triglicérides são sintetizados no intestino e principalmente no fígado (MOTTA, 2003). A avaliação de triglicérides auxilia no diagnóstico de doenças ateroscleróticas e avalia a metabolização de gordura pelo corpo. Aumento dos níveis de triglicérides estão presentes principalmente na hiperlipoproteinemia, hepatopatia, insuficiência renal, hipotireoidismo, diabetes melitos e pancreatite (FISCHBACH; DUNNING, 2010).

A quebra da creatina, substância encontrada nos tecidos musculares, resulta na creatinina. A excreção da creatinina ocorre apenas por via renal. Quando há distúrbio na função renal a excreção de creatinina diminui, o que leva a um aumento da sua concentração plasmática (BUSH, 2004; FISCHBACH; DUNNING, 2010; KERR, 2003).

Pereira e colaboradores (2011), em um estudo realizado com ratos Wistar, não encontraram alterações nas enzimas hepáticas ALT e AST e no marcador renal

creatinina, porém a ureia encontrou-se elevada no grupo tratado com fração de polissacarídeos de vagens de *Caesalpinia ferrea* (0,001 g/kg) em relação ao grupo controle. Ao contrário do apresentado no estudo de Pereira e colaboradores (2011), não encontramos alteração nas concentrações de ureia no soro, no líquido amniótico e na placenta, porém obtivemos um aumento nos níveis de creatinina no soro do grupo tratado com o extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes, o que também indica uma dano renal. Devemos considerar que os autores utilizaram a vagem e não as sementes da *Caesalpinia ferrea*.

Estudando ratas prenhes alimentadas com rações contendo o alcaloide monocrotalina a 0,02%, Medeiros, Górnaiak e Guerra (2000), realizaram análises séricas e obtiveram concentrações significativamente maiores dos parâmetros AST, ureia e creatinina. O peso dos fetos e placentas foram menores quando comparados ao grupo controle.

O cálcio está presente principalmente nos ossos e dentes, apenas 1% de cálcio está presente no plasma. Cerca de metade do cálcio plasmático está na sua forma ionizada (fração biologicamente ativa) e está envolvido na transmissão de impulsos nervosos, contração muscular e coagulação sanguínea; a outra metade está ligada à proteínas, principalmente à albumina, e quelado com ânions (fração biologicamente inativa). Quedas nos níveis de albumina, levam à uma redução da quantidade total de cálcio, porém sem afetar a forma ionizada do cálcio, não causando alteração clínica expressiva. Apenas a redução do cálcio ionizado pode causar sintomas clínicos significativos (BUSH, 2004).

Os valores de cálcio foram significativamente menores no líquido amniótico dos fetos do grupo de ratas tratadas com semente ($2,10 \pm 0,22$), quando comparado aos valores apresentados pelos fetos de ratas do grupo controle ($2,34 \pm 0,19$). Sabe-se que os fetos estão no estágio final de ossificação e necessitam do cálcio nesse processo. Uma baixa de cálcio nessa fase fetal pode prejudicar a formação óssea.

Em um estudo realizado com ratas gestantes, LaBorde e colaboradores (1999) realizaram dosagens bioquímicas e hematológicas no sangue de ratas Sprague Dawley saudáveis no final da gestação e encontraram os seguintes valores (média $\pm$ desvio padrão): Leucócitos $10^9/L$ ($10,4 \pm 2,9$), hemácias $10^{12}/L$ ($5,99 \pm 0,52$), hemoglobina g/dL ($12,2 \pm 0,9$), hematócrito % ($35,3 \pm 2,6$), VCM fL ($58,2 \pm 1,8$), HCM pg ($20,4 \pm 0,6$), CHCM g/dL ($34,8 \pm 0,8$), plaquetas $10^9/L$ (824 ± 129), colesterol mmol/L ($2,25 \pm 0,46$), triglicérides mmol/L ($5,59 \pm 2,68$), ALT U/L ($66,4 \pm 12,9$), creatinina

$\mu\text{mol/L}$ ($78,5 \pm 9,31$), ureia mmol/L ($6,53 \pm 1,52$), glicose mmol/L ($4,85 \pm 0,83$) e cálcio mmol/L ($2,78 \pm 0,16$). Obtivemos valores maiores de VCM, colesterol, triglicérides e glicose, semelhantes de hemácia e ALT, e menores de leucócito, hemoglobina, hematócrito, HCM, CHCM, plaquetas, creatinina, ureia e cálcio em relação ao estudo de LaBorde e colaboradores (1999). Devemos considerar que a espécie de ratas utilizadas nos estudos são diferentes.

O líquido amniótico é um componente essencial para o desenvolvimento e manutenção fetal durante o período gestacional, possuindo uma função protetora. É sintetizado a partir da filtração do sangue materno e também da própria atividade fetal, que desempenha um importante papel em sua composição bioquímica (FRESNO et al., 2012). Rico em aminoácidos, o líquido amniótico inicialmente é absorvido pelo feto através da pele não queratinizada, e após, ingerido através da deglutição (GUREKIAN; KOSKI, 2005).

Olfati e colaboradores (2014) determinaram os valores de glicose ($2,62 \pm 0,19$), ureia ($78,1 \pm 17,4$), creatinina ($11,69 \pm 3,23$), proteína total ($1,01 \pm 0,11$), colesterol ($2,95 \pm 0,87$), triglicérides ($0,79 \pm 0,07$), cálcio ($3,34 \pm 1,08$) e fósforo ($3,98 \pm 1,12$) no líquido amniótico de ovelhas iranianas mestiças. Os resultados foram expressos em mg/dL , média e desvio padrão. Zogno, Miglino e Oliveira (2004) realizaram um estudo no líquido amniótico de fêmeas de mocó a fim de se obter os valores de referência dos parâmetros bioquímicos glicose, cálcio, creatinina e ureia. Os resultados encontrados, em mg/dL , expressos em média e desvio padrão foram: glicose ($45,87 \pm 22,38$), cálcio ($6,31 \pm 1,24$), creatinina ($0,45 \pm 0,12$) e ureia ($34,03 \pm 5,96$). Em nosso trabalho encontramos como resultado $36,75 \text{ mg/dL}$ de glicose ($\pm 3,99$), $48,04 \text{ mg/dL}$ de ureia ($\pm 2,76$) e $2,34 \text{ mmol/L}$ de cálcio ($\pm 0,019$).

A glicose exerce uma função importante na nutrição de embriões. Na fase embrionária, a cavidade amniótica é uma importante porta de entrada para a glicose (SHEPARD; TANIMURA; PARK, 1997). Segundo Weiss e colaboradores (1985) a quantidade de glicose no sangue materno representa o perfil de glicose encontrado no líquido amniótico e que foi transportado para o feto.

Apesar de os níveis de glicose sérico não terem apresentado diferença entre os grupos, encontramos um aumento significativo na concentração de glicose no líquido amniótico das ratas gestantes que receberam os extratos hidroalcoólicos secos reconstituídos de cascas ($44,52 \pm 1,81$) e sementes ($43,35 \pm 5,24$), em comparação ao grupo controle ($36,75 \pm 3,99$). Vasconcelos e colaboradores (2011) encontraram

uma atividade hipoglicemiante da *Caesalpinia ferrea*, em um estudo onde o extrato aquoso da casca do caule da *Caesalpinia ferrea* nas doses de 300 mg/kg/dia e 450 mg/kg/dia foi administrado à ratos Wistar machos diabéticos induzidos pela estreptozotocina. Os autores concluíram que o extrato aquoso da casca da *Caesalpinia ferrea* é uma boa alternativa para se tratar a diabetes.

O hemograma é um exame comumente solicitado na prática clínica, auxilia no diagnóstico de diversas doenças e expressa a quantidade de células sanguíneas e os desvios qualitativos relacionados à essas células, resultando na condição do sangue periférico naquele momento (VERRASTRO; LORENZI; NETO, 1998).

Os eosinófilos possuem grânulos citoplasmáticos ricos em histamina, importantes na resposta alérgica, e também realizam fagocitose, ingerindo complexos antígeno-anticorpo (FISCHBACH; DUNNING, 2010). A eosinofilia pode ser encontrada mais comumente em alergias, parasitoses e hemopatias (MILLER, 1999; VERRASTRO; LORENZI; NETO, 1998). De acordo com Kerr (2003), a placenta canina possui grande quantidade de eosinófilos, e na gestação ou parto recente ocorre um aumento no número de eosinófilos circulantes, associado à presença da placenta dentro do útero. Encontramos um aumento no número de eosinófilos no grupo tratado com extrato hidroalcoólico seco reconstituído de semente, em comparação ao grupo controle.

As plaquetas, células importantes na hemostasia, exercem função considerável na coagulação sanguínea (MILLER, 1999). São responsáveis por manter íntegro o endotélio vascular e pela reparação do endotélio lesado, auxiliando na coagulação. Na trombocitopenia, o endotélio enfraquece e pode ocorrer saída de hemácias pela parede dos capilares, ocasionando petéquias, equimoses e hemorragia espontânea (KERR, 2003). Obtivemos uma contagem de plaquetas significativamente menor nas ratas gestantes que receberam o extrato hidroalcoólico seco reconstituído de semente ($490,33 \pm 125,03$) em relação ao grupo controle ($729,25 \pm 105,43$).

Embora, não obtivemos alteração na contagem de leucócitos ($6,59 \pm 0,85$ – GC, $7,31 \pm 2,17$ – GCas e $8,66 \pm 3,37$ – GSem), Freitas e colaboradores (2012) em um ensaio anti-inflamatório (peritonite induzida por carragenina), encontraram um diminuição de leucócitos em camundongos fêmeas tratadas com extrato bruto e com uma fração parcialmente purificada de vagens de *Caesalpinia ferrea* na dose de 100 mg/kg, indicando um efeito anti-inflamatório.

Em outro estudo realizado com ratos Wistar, Pereira e colaboradores (2011) encontraram atividade anti-inflamatória de extratos e frações de polissacarídeos de

vagens de *Caesalpinia ferrea* em edema induzido por carragenina, além disso encontraram também uma diminuição significativa no número de linfócitos ($22,14 \pm 2,19$ – Salina, $2,33 \pm 0,55$ – *Caesalpinia ferrea*) e aumento no número de monócitos ($2\ 57 \pm 0\ 48$ – Salina, $73\ 5 \pm 2,41$ – *Caesalpinia ferrea*) no grupo tratado com a fração de polissacarídeos de *Caesalpinia ferrea*, o que não foi encontrado em nosso estudo. Os autores não encontraram alteração no número de plaquetas e eosinófilos.

O extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* e a porção lipídica de *Caesalpinia ferrea* apresentaram um efeito antinociceptivo dose dependente em estudo realizado com ratos Wistar machos (SAWADA et al., 2014), demonstrando seu efeito anti-inflamatório e analgésico.

O estresse oxidativo é determinado pelo aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, estando presente em muitas doenças agudas e crônicas e inclusive no processo normal de envelhecimento (DALLE-DONNE et al., 2006). O termo antioxidante é muito utilizado e segundo Gutteridge (1995) se refere a todas as substâncias que apresentem baixas concentrações em comparação à concentração presente no substrato que se oxida, e conseguem retardar ou inibir a oxidação do substrato. Grandes pesquisas têm sido feitas em modelos de estudo animal, com enfoque em substâncias bioativas naturais com propriedades antioxidantes (MOHAN et al., 2014).

Em nossos estudos não foram encontradas alterações significativas nos valores de concentração de GSH ($0,466 \pm 0,068$ – GC, $0,544 \pm 0,148$ – GCas e $0,574 \pm 0,113$ – GSem) e na atividade das enzimas catalase ($0,895 \pm 2,466$ – GC, $8,925 \pm 1,521$ GCas e $12,014 \pm 3,164$ – GSem) e GPx ($31,651 \pm 14,54$ – GC, $23,47 \pm 7,531$ – GCas e $25,977 \pm 8,388$ – GSem), demonstrando que o extrato hidroalcoólico seco reconstituído de cascas e o extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de *Caesalpinia ferrea* não exerce efeito antioxidante.

Apesar de não termos encontrado em nosso estudo, alterações significativas nos parâmetros de estresse oxidativo, em estudo realizado por Silva e colaboradores (2011), o extrato hidroalcoólico de frutos de *Caesalpinia ferrea* mostrou ter uma grande atividade antioxidante em ensaios *in vitro*. Os autores relacionaram essa atividade antioxidante com o alto teor fenólico presente na planta.

Vasconcelos e colaboradores (2011), também encontraram uma diminuição do estresse oxidativo, representada pela diminuição dos níveis de substâncias reativas

ao ácido tiobarbitúrico, no soro e no fígado dos animais diabéticos expostos o extrato aquoso da casca do caule da *Caesalpinia ferrea*.

7 CONCLUSÃO

A *Caesalpinia ferrea*, na dose estudada, não promoveu alterações no ganho de peso das gestantes, nas perdas pré-implantação ou nas perdas pós-implantação, indicando que não interfere com a capacidade reprodutiva dos animais.

O grupo tratado com extrato de cascas apresentou um baixo peso de placenta, o que pode levar à uma toxicidade sobre o desenvolvimento da prole.

Creatinina, plaquetas e eosinófilos encontraram-se alterados no sangue materno do grupo que recebeu o extrato de sementes de *Caesalpinia ferrea*, indicando uma provável toxicidade materna.

A toxicidade fetal foi demonstrada através de alterações encontradas nos parâmetros AST, glicose e cálcio no líquido amniótico, e triglicérides na placenta dos fetos.

Estes dados, tomados em conjunto, sugerem que o extrato hidroalcoólico seco reconstituído de sementes de *Caesalpinia ferrea* na dose utilizada não é seguro quando administrado diariamente durante o período de gestação de ratas.

REFERÊNCIAS

Aebi H. Catalase *in vitro*. Meth Enzymol 1984; 105:121-126.

Almeida RN, Agra MF. Short bibliography of medicinal plants for the treatment of diabetes and some experimental results. Rev Bras Farm 1986; 67:105-110.

Asgharnia M, Mirblouk F, Salamat F, Ashrafxhani B, Dirbaz Z. Predictive value of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels in vaginal fluid for the diagnosis of premature rupture of membranes. Iran J Reprod Med. 2014 Apr; 12(4):269-74.

Bacchi EM, Sertié JA. Chromatographic identification and pharmacologic action of *Styrax camporum* Pohl and *Caesalpinia ferrea* Martius. Rev Farm Bioquim. Univ São Paulo 1991; 27(2):137-49.

Bacchi EM, Sertié JA. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. Planta Med. 1994 Apr; 60(2):118-20.

Bacchi EM, Sertié JA, Villa N, Katz H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. Planta Med 1995 Jun; 61(3):204-7.

Barros MAG. Flora medicinal do Distrito Federal. v.12, n.50. Brasília: Brasil Florestal, 1982.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/Acesso>> em: 24 julh. 2012.

Braga R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Oficial. 1960

Braz MSS. Morfologia, germinação e produção de mudas de leguminosas arbóreas ocorrentes na mata do Pau-Ferro, Areia, Paraíba [tese]. Paraíba: Universidade Federal da Paraíba/Areia, 2007.

Bush BM. Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais. São Paulo: Rocca, 2004.

Carvalho AA, Menezes IA, Antonioli AR, Santos MR. Effect of the chronic treatment with aqueous extract of *Caesalpinia ferrea* and *Chrysobalanus icaco* on the vascular reactivity of diabetic rats. *Lat Am J Pharm.* 2010; 29(5):845-848.

Carvalho JC, Teixeira JR, Souza PJ, Bastos JK, dos Santos Filho D, Sarti SJ. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *J Ethnopharmacol.* 1996 Sep; 53(3):175-8.

Carvalho JCT. *Caesalpinia ferrea* (pau-ferro): avaliação da atividade anti-inflamatória e analgésica [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1993.

Cavalheiro MG, Farias DF, Fernandes GS, Nunes EP, Cavalcanti FS, Vasconcelos IM, Melo VMM, Carvalho AFU. Biological and enzymatic activities of aqueous extract of seeds from *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. *Rev Bras Farmacogn.* 2009; 19(2b):586-591.

Coelho RG. Estudo químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae) [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, 2004.

Cotechini T, Hopman WJ, Graham CH. Inflammation-induced fetal growth restriction in rats is associated with altered placental morphometrics. *Placenta* 2014; 35:575-581.

Cury G. Descrição da estrutura anatômica do lenho e sua aplicação na identificação de espécies arbóreas do cerrado e da mata atlântica do estado de São Paulo [dissertação]. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz De Queiroz, 2002.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006; 52(4):601-623.

Dantas JA, Ambiel CR, Cuman RKN, Baroni S, Bersani-Amado CA. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual do Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci. Health Sci.* 2006; 28(2): 165-170.

Da Silva FRRP. Efeitos Imunomoduladores do Extrato Bruto de *Caesalpinia ferrea* sobre o Crescimento e Diferenciação de Precursores Hematopoiéticos da Medula Óssea em camundongos [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1999.

De Mello FB, De Mello JRB. Evaluation of antitussive/expectorant effects of two phytotherapeutic formulations existent in the Brazilian market. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 2006; 25(1):64-70.

De Oliveira, AF. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* (tul.) Martius (Jucá) em lesões cutâneas de caprinos [dissertação]. Mossoró: Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2008.

De Souza CF. Galactomanana de sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*: estrutura, modificação química e caracterização de propriedades [dissertação]. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2009.

Dewick PM. Medicinal natural products. Chichester: John Wiley & Sons, 1998.

Di Stasi SM, Poggi A, Giannantoni A, Zampa G. Dermatomyositis associated with testicular germ cell cancer. *J Urol* 2000 Jan; 163(1):240.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82(1):70-77.

European Patent Office. 2011. [acesso em 06 de janeiro 2015]. Disponível em: www.european-ip-attorneys.org.

Farmacopeia Portuguesa. Lisboa: Infarmed Editora, 2002.

Fiol FS, Gerenutti M, Groppo FC. Antibiotics and pregnancy. *Pharmazie* 2005; 60(7):483-493.

Fischbach FT, Dunning MB. Manual de enfermagem: Exames laboratoriais e diagnósticos. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

Frasson APZ, Bittencourt CF, Heinzmann BM. Physico-chemical and biological characterization of *Caesalpinia ferrea* Mart. Stems. *Rev Bras Farmacogn*. 2003; 13(1):35-39.

Freitas ACC, Ximenes NCA, Aguiar JS, Nascimento SC, Lins TUL, Magalhães LR, Coelho LCBB, Carneiro da Cunha MG, Gonçalves Silva T, Correia MTS. Biological activities of *Libidibia* (*Caesalpinia*) *ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L P. Quieroz pod preparations. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012; 2012:1-7.

Fréjaville JP, Kamoun P. Manual de exames de laboratório. São Paulo: Editora Atheneu, 1989.

Fresno L, Rodriguez Gil JE, Rigau T, Pastor J, Rivera del Alamo MM. Modulation of the biochemical composition of amniotic and allantoic fluids as a control mechanism of feline foetal development. *Placenta* 2012; 33:522-527.

Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A. A comparison of the histological structure of the placenta in the experimental animals. *J Toxicol. Patol* 2014; 27:11-18.

Gerenutti M, Fiol FS, Groppo FC. Reproductive performance of pregnant rats and embryotoxic effects of ciprofloxacin. *Pharmazie* 2006; 61:79-80.

Gerenutti M, Rollo AFP, Glauzer M, Fiol FS, Oshima-Franco Y, Venancio PC, Groppo FC. The effect of *Cecropia glazioui* Snethlage on the physical and neurobehavioral development of rats. *Pharmazie* 2008; 63:1-7.

Gerenutti M, Spinosa HS, Bernardi MM. Effects of braken fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) feeding during the development of female rats and their offspring. *Vet Human Toxicol* 1992; 34(5):307-310.

Gonzalez FG. Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Caesalpinia ferrea* Martius [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005.

Gurekian CN, Koski KG. Amniotic fluid amino acid concentrations are modified by maternal dietary glucose, gestational age, and fetal growth in rats. *J Nutri.* 2005; 135(9):2219-24.

Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41:1819-1828.

IPNI. The Internacional Plant Name Index. 2008 [acesso em 06 de janeiro 2015]. Disponível em: <http://www.ipni.org/ipni/pantnamesearchpage.do>.

Kerr MG. Exames laboratoriais em medicina veterinária: Bioquímica clínica e hematologia. São Paulo: Roca, 2003.

Kirbas A, Biberoglu E, Daglar K, İskender C, Erkaya S, Dede H, Uygur D, Danisman N. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a diagnostic marker of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014 Sep; 180:12-5.

LaBorde JB, Wall KS, Bolon B, Kumpe TS, Patton R, Zheng Q, Kodell R, Young JF. Haematology and serum chemistry parameters of the pregnant rat. *Lab Anim* 1999; 33:275-287.

Latipat. 2011 [acesso em 06 de janeiro de 2015]. Disponível em: lp.espacenet.com/.

Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora do Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998.

Lucinda LM, Rocha CB, Reboredo MM, Faria VC, Sá RC. Assessment of sperm production and reproductive organs of Wistar rats to long-term exposure of *Caesalpinia ferrea*. *An Acad Bras Cienc*. 2010 Dec; 82(4):907-914.

Medeiros RMT, Górnaiak SL, Guerra JL. Fetotoxicity and reproductive effects of monocrotaline in pregnant rats. *J Ethnopharmacol*. 2000; 69:181-188.

Menezes IA, Moreira IJ, Carvalho AA, Antonioli AR, Santos MR. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. *Vascul Pharmacol*. 2007 Jul; 47(1):41-7.

Miller O. Laboratório para o clínico. 8 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.

Mobot. Missouri Botanical Garden. 2012 [acesso em 13 de março de 2012]. Disponível em: <http://www.mobot.org/>.

Mohan S, Thiagarajan K, Chandrasekaran R, Arul J. *In vitro* protection of biological macromolecules against oxidative stress and *in vivo* toxicity evaluation of *Acacia nilotica* (L.) and ethyl gallate in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014; 14:257.

Motta VT. Bioquímica clínica: Princípios e interpretações. 4 ed. São Paulo: Robe, 2003.

Nakamura ES, Kurosaki F, Arisawa M, Mukainaka T, Takayasu J, Okuda M, Tokuda H, Nishino H, Pastore F. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on *in vivo* two-stage skin carcinogenesis. *J Ethnopharmacol*. 2002 Jun; 81(1):135-7.

Nozaki H, Hayashi K-i, Kakumoto K, Ikeda S, Kido M, Tani H, Matsuura N, Takaoka D, Iinuma M, Akao Y. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. *Tetrahedron Lett.* 2007; 48(47):8290-92.

Olfati A, Moghaddam G, Kor NM, Bakhtiari M. The relationship between progesterone and biochemical constituents of amniotic fluid with placenta traits in Iranian crossbred ewes (ArkharMerino x Ghezel). *Asian Pac J Trop Med.* 2014; 7(1):S162-S166.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab & Clin. Med.* 1967; 70(1):158-169.

Pavan FR, Sato DN, Higuchi CT, Santos AC, Leite CQ. *In vitro* anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some Brazilian "Cerrado" plants. *Rev Bras de Farmacogn.* 2009; 19(1B):204-206.

Pereira LP, Silva RO, Bringel PHSF, Silva KES, Assreuy AMS, Pereira MG. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potencial anti-inflammatory usage. *J Ethnopharmacol.* 2011; 139:642-648.

Pio Correa M. Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional IBDF, 1984.

Queiroz ML, Justo GZ, Valadares MC, Pereira-da-silva FR. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2001 Aug; 23(3):367-82.

Reis JBC. Composição químico-bromatológica de leucena (*Leucaena leucocephala* (lam.) de wit) e de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart.) em três alturas de corte [dissertação]. Teresina: Universidade Federal do Piauí, 2001.

Rivera VVA. Investigação teórica da reatividade de trans-trans-Farnesol isolado das folhas de *Caesalpinia ferrea* (Jucá) [dissertação]. Amazonas: Universidade Federal do Amazonas, 1999.

Sampaio FC, Pereira M do S, Dias CS, Costa VC, Conde NC, Buzalaf MA. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J Ethnopharmacol.* 2009 Jul 15; 124(2):289-94.

Sanguinetti EE. Plantas que curam. Porto Alegre: Rígel, 1989.

Sawada LA, Monteiro VSC, Rabelo GR, Dias GB, Cunha M, Nascimento JLM, Bastos GNT. *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central pathway: Possible involvement of opioid and cholinergic receptors. *BioMed Research Internat.* 2014; 2014:1-10.

Shepard TH, Tanimura T, Park HW. Glucose absorption and utilization by rat embryos. *Int J Dev Biol* 1997; 41(2):307-314.

Silva ACC. Avaliação das atividades citotóxica, antitumoral, antiinflamatória e analgésica do extrato bruto e de uma fração parcialmente purificada da vagem de *Caesalpinia ferrea* Mart [dissertação]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

Silva LCN, Silva Júnior CA, Souza RM, Macedo AJ, Silva MV, Correia MTS. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicol.* 2011; 49:2222-28.

Silva SN. Purificação e caracterização de preparações lectínicas de folhas de *Caesalpinia ferrea*: avaliação biológica [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

Souza SO. A implantação do blastocisto em ratos (*rattus norvegicus berkenhout*, 1769) após o tratamento com extrato seco de *Caesalpinia ferrea* Mart. (leguminosae) [dissertação]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2005.

Souza AB, Souza LMS, Carvalho JCT, Maistro EL. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. *Genet Mol Boil* 2006; 29(2):380-383.

Souza VH, Barbosa APO, Cardoso GC, Marreto RN, Barreto Filho JAS, Antonioli AR, Santos MRV. Evaluation of the antidiabetic potential of five medicinal plants in rats. *Acta Farm Bonae.* 2009; 28(4):609-612.

Storey C, Salem JI. Lay use of Amazonian plants for the treatment of tuberculosis. *Acta Amaz.* 1997; 27(3):175-82.

Ueda H, Kawanishi K, Moriyasu M. Effects of ellagic acid and 2-(2,3,6-trihydroxy-4-carboxyphenyl) ellagic acid on sorbitol accumulation *in vitro* and *in vivo*. *Biol Pharm Bull* 2004 Oct; 27(10):1584-7.

Ueda H, Tachibana Y, Moriyasu M, Kawanishi K, Alves SM. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. *Phytomedicine* 2001 Sep; 8(5):377-81.

Weiss PA, Hofmann H, Winter R, Pürstner P, Lichtenegger W. Amniotic fluid glucose values in normal and abnormal pregnancies. *Obstet Gynecol.* 1985; 65(3):333-339.

Vasconcelos CFB, Maranhão HML, Batista TM, Carneiro EM, Ferreira F, Costa J, Soares LAL, Sá MDC, Souza TP, Wanderley AG. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137:1533-1541.

Verrastro T, Lorenzi TF, Neto SW. Hematologia e hemoterapia: Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

Zaia HABA. Desenvolvimento floral de *Caesalpinia echinata* LAM, *Caesalpinia peltophoroides* BENTH e *Caesalpinia ferrea* var. *leyotachia* BENTH. (Fabaceae/ Caesalpinioideae) [dissertação]. Piracicaba: Universidade De São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz De Queiroz”, 2004.

Zogno MA, Miglino MA, Oliveira MF. Análise bioquímica dos líquidos fetais e citologia do fluido amniótico da fêmea de Mocó (*Kerodon rupestris*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2004; 41:228-235.

ANEXO A – Ficha de catalogação da *Caesalpinia ferrea* no herbário da UFRN

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE CENTRO DE BIOCÊNCIAS - DPT. BOTÂNICA, ECOLOGIA E ZOOLOGIA HERBÁRIO UFRN	UFRN 12181
	Brasil, Rio Grande do Norte, Cruzeta, fazenda ca. de 10 Km da sede municipal, na estrada. Caatinga antropizada. 6°21'09" S, 36°47'32" W Alt: 230m	
Fabaceae-Caes.		
<i>Libidibia ferrea</i> (Mart.) L.P. Queiroz		
Det.: Costa-Lima, J.L., 6 outubro 2011 Arborescente, ca. 3,0-4,0 m alt.; caule liso, de coloração cinérea, apresentando manchas esbranquiçadas. Folíolos cartáceos, discolores, face superior verde-escura, inferior glauca. Frutos imaturos verdes, maduros amarronzados. Obs.: Casca coletada para estudos farmacológicos.		
N.V.: "jucá"; "pau-ferro"		
Costa-Lima, J.L. 601 & Ruiz, R.O.; Santos, E.A.L., 06/10/2011		

ANEXO B – Certificado de procedência de animais



Paulínia, 01/09/2014

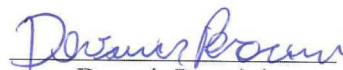
CERTIFICADO DE PROCEDÊNCIA DE ANIMAIS

Fornecedor:

Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA.EPP.
Rua: Servidão Quatro, 292, São Domingos, Paulínia-SP.
CEP. 13140-000
Fone/Fax: (019) 3874-4538.
E-mail: anilab@anilab.com.br

Declaro, para os devidos fins, as informações referentes aos animais
(*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) enviados a UNIVERSIDADE DE
SOROCABA.

ESPÉCIE ANIMAL ADQUIRIDA	RATOS WISTAR
Quantidade de Machos	05
Quantidade de Fêmeas	30
Total	35
Data de Nascimento	14/07/2014
Idade dos Animais na Data de Envio	7 semanas
Data de Envio	01/09/2014
Nota Fiscal nº	002229


Devanir Perecini

ANEXO C – Atestado de saúde animal**Paulínia, 01/09/2014****ATESTADO DE SANIDADE ANIMAL**

Atesto para os devidos fins que os RATOS WISTAR procedentes deste estabelecimento, CONSTANTES NA NOTA FISCAL 002229 estão em *perfeitas condições de saúde e livres de doenças infecto-contagiosas*, cumprindo-se, dessa forma, o que determinam os dispositivos legais vigentes, no que se referem às exigências sanitárias para o deslocamento dos animais.

Outrossim, informo que os referidos animais são provenientes de matrizes igualmente saudáveis e isentas de quaisquer tipos de tratamento medicamentoso ou por meio de vacinas

Atenciosamente,


Devanir Paracini
Médico Veterinário
CRMV-SP 32825

ANEXO D – Certificado de aprovação em CEUA-Uniso

UNIVERSIDADE DE SOROCABA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CEUA-UNISO

PARECER

Protocolo nº 001/2012
Interessado: Marli Gerenutti
Orientador: -
Título do Projeto: Avaliação biológica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do extrato hidroalcoólico de <i>Caesalpinia ferrea</i> (<i>Libidibia ferrea</i>)
Título do Experimento: Avaliação biológica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do extrato hidroalcoólico de <i>Caesalpinia ferrea</i> (<i>Libidibia ferrea</i>)

Apresentado a Comissão de ética no uso de animais (CEUA) para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

☒ **APROVADO.**

☐ **APROVADO com RECOMENDAÇÃO**, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

☐ **COM PENDÊNCIA**, devendo o proponente readequar os itens do protocolo;

☐ **REPROVADO**

Manifestação do Parecerista:

1º Parecer

Pendências:

Revisar números de animais utilizados em cada etapa.

Verificar similaridade entre projeto e formulário Ceua-Uniso.

Rever método de eutanásia, pois não está de acordo com Resolução CRMV nº 1000, de 11 de maio de 2012.

O item 10.2 não se aplica.

2º Parecer

Aprovado com recomendação:

Baseado no número de animais utilizados no projeto existe um grupo onde a proporção indicada não será cumprida.

Verificar os itens: (i) 10.7 onde a cirurgia será cesária e, conforme projeto não cesária *por moten*; (ii) 10.7 o projeto indica exposição dos animais ao extrato em questão; e (iii) o projeto prevê extração de materiais biológicos –útero (feto), ovários e placenta.

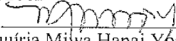
Como o projeto não foi executado, solicitamos rever o tempo verbal.

O Projeto pode ter seu andamento cumprido às recomendações acima descritas.

3º Parecer

Aprovado

Data: 14/11/2012

Assinatura: 

Nome: Valquíria Miywa Hanai Yoshida

Coordenadora da CEUA-UNISO

* Encaminhar cópia deste parecer para o e-mail ceua@uniso.br e original assinado para a Seção Técnica Acadêmica

ANEXO E – Certificado de palestra proferida em curso de graduação “Curva de calibração”



*Certifico que **Thaís Borim Pickler** esteve no dia 30 de outubro de 2013, ministrando palestra sob o tema “**CURVA DE CALIBRAÇÃO**”, aos alunos do Curso de Farmácia da Uniso. A palestra foi realizada na dentro do componente **Práticas Integradas em Farmacologia, Fisiologia e Bioquímica**, ministrado pela **Profa. Dra. Marli Gerenutti**.*

Sorocaba, 30 de outubro de 2013.

Prof.ª M.ª Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia

Curso de Farmácia
Certificado registrado eletronicamente



**ANEXO F – Certificado de palestra proferida em curso de graduação
“Fármacos hipoglicemiantes e anti-hiperglicemiantes e determinação da
glicemia”**



*Certifico que **Thaís Borim Pickler** esteve no dia
06 de novembro de 2013, ministrando palestra sob o
tema “**FÁRMACOS HIPOGLICEMIANTE E
ANTI-HIPERGLICEMIANTE E
DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA**”, aos alunos do
Curso de Farmácia da Uniso. A palestra foi
realizada na dentro do componente **Práticas
Integradas em Farmacologia, Fisiologia e
Bioquímica**, ministrado pela **Profa. Dra. Marli
Gerenutti**.*

Curso de Farmácia
Certificado registrado eletronicamente



Sorocaba, 06 de novembro de 2013.

Prof.ª M. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia

ANEXO G – Certificado de palestra proferida em curso de graduação “Análise bioquímica em equipamento Cobas (Roche)”



*Certifico que **Thaís Borim Pickler** esteve no dia 27 de novembro de 2013, ministrando palestra sob o tema “**ANÁLISE BIOQUÍMICA EM EQUIPAMENTO COBAS (ROCHE)**”, aos alunos do Curso de Farmácia da Uniso. A palestra foi realizada na dentro do componente **Práticas Integradas em Farmacologia, Fisiologia e Bioquímica**, ministrado pela **Profa. Dra. Marli Gerenutti**.*

Sorocaba, 27 de novembro de 2013.

Curso de Farmácia
Certificado registrado eletronicamente



Prof.ª M.ª Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia

ANEXO H – Certificado de participação como examinador na banca “Avaliação bioquímica da exposição ao extrato hidroalcoólico de *Psidium guajava* Linn durante a gestação de ratos”



UNISO

Certificamos que Prof^ª. Denise Grotto, Thaisa Borim Pickler e Prof^ª. Marli Gerenutti (Presidente da banca e Orientadora) participaram como examinadores na Banca de Avaliação Final do trabalho de Prática de Pesquisa III dos (as) alunos (as) Larissa Cremer de Moraes e Késsia Monique Bello intitulado: “AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DA EXPOSIÇÃO AO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PSIDIUM GUAJAVA LINN DURANTE A GESTAÇÃO DE RATOS” ocorrida no dia 14 de novembro de 2013, no curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba.

Curso de Farmácia
Certificado registrado eletronicamente



Sorocaba, 14 de novembro de 2013.

Prof^ª. M^ª. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia

ANEXO I – Certificado de participação como examinador na banca “Análise fitoquímica e físico-química da *Psidium guajava* Linn”



Certificamos que Prof^ª. Denise Grotto, Thaisa Borim Pickler e Prof^ª. Marli Gerenutti (Presidente da banca e Orientadora) participaram como examinadores na Banca de Avaliação Final do trabalho de Prática de Pesquisa III dos (as) alunos (as) Arielly Leme de Góes e Flávia Gonzales de Faria Galdino intitulado: “ANÁLISE FITOQUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA DA PSIDIUM GUAJAVA LINN.” ocorrida no dia 14 de novembro de 2013, no curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba.



Sorocaba, 14 de novembro de 2013.

Prof^ª. M^ª. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia

ANEXO J – Certificado de participação como examinador na banca
“Avaliação da concentração de quercetina em amostras de chá branco e chá
vermelho a base da planta *Camellia sinensis*”



UNISO

Certificamos que Prof^ª. Denise Grotto, Thaisa Borim Pickler e Prof^ª. Marli Gerenutti (Presidente da banca e Orientadora) participaram como examinadores na Banca de Avaliação Final do trabalho de Prática de Pesquisa III dos (as) alunos (as) Juliana Carvalho Almeida e Karen Suzane Zuim intitulado: “AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE QUERCETINA EM AMOSTRAS DE CHÁ BRANCO E CHÁ VERMELHO A BASE DA PLANTA CAMELLIA SINENSIS” ocorrida no dia 14 de novembro de 2013, no curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba.



Sorocaba, 14 de novembro de 2013.

Prof^ª. M^ª. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia

ANEXO K – Certificado de apresentação de trabalho no Toxi-Latin 2014

CERTIFICATE

89



We certify that the abstract

FOOD SAFETY EVALUATION ON SHIITAKE MUSHROOM INTAKE

Ramos, GKA.; Costa, SR; Bueno, DCR; Pickler, TB; Grotto, D.

was presented in **1st Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology - TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT FOR THE ADVANCES OF TOXICOLOGY AND PROMOTION OF HEALTH**, held in Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, on April 27th – 30th, 2014.

Dra. Solange Cristina Garcia
 Presidente da Comissão Organizadora do TOXI-LATIN 2014

Dra. Daiana Silva Ávila
 Presidente da Comissão Científica do TOXI-LATIN 2014

ANEXO L – Artigo “Reproductive performance of pregnant rats: Effects of *Morus nigra* tincture” publicado na revista Reproductive Toxicology

	Reproductive Toxicology	
	Volume 48, September 2014, Pages 24	
	42nd Annual Conference of the European Teratology Society	

P-3

Reproductive performance of pregnant rats: Effects of *Morus nigra* tincture

Thais F. Almeida , Daniele O. Benedicto, Giovana Sabadim, Thaisa B. Pickler, Denise Grotto, Marli Gerenutti

Laboratory for the Toxicological Research (Lapetox), University of Sorocaba, Sorocaba, São Paulo, Brazil

Available online 22 August 2014

 **CrossMark**

☐ [Show less](#)

Choose an option to locate/access this article:

Check if you have access through your login credentials or your institution Check access	 Purchase \$35.95	Get Full Text Elsewhere
--	--	--

doi:10.1016/j.reprotox.2014.07.031  [Get rights and content](#)

 Corresponding author.

Copyright © 2014 Published by Elsevier Inc.

ANEXO M – Artigo “Skeletal hypoplasia and visceral changes in rats exposed to *Psidium guajava* Linn during gestation” publicado na revista Reproductive Toxicology



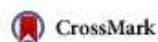
P-14

Skeletal hypoplasia and visceral changes in rats exposed to *Psidium guajava* Linn during gestation

Julio C. Vieira , Karina P. Lopes, Giovana Sabadim, Thaisa B. Pickler, Magali G. Silva, Denise Grotto, M. Gerenutti

Laboratory for the Toxicological Research (Lapetox), University of Sorocaba, Sorocaba, São Paulo, Brazil

Available online 22 August 2014



☐ Show less

Choose an option to locate/access this article:

Check if you have access
through your login credentials
or your institution

[Check access](#)

 **Purchase \$35.95**

[Get Full Text Elsewhere](#)

doi:10.1016/j.reprotox.2014.07.042

 [Get rights and content](#)

 Corresponding author.

Copyright © 2014 Published by Elsevier Inc.

**ANEXO N – Artigo “Alterations in the reproductive performance of the female rats and fetotoxicity of *Lentinula edodes* (Shiitake)” publicado na revista
Reproductive Toxicology**



Reproductive Toxicology

Volume 48, September 2014, Pages 25

42nd Annual Conference of the European Teratology Society



P-6

Alterations in the reproductive performance of the female rats and fetotoxicity of *Lentinula edodes* (Shiitake)

Ítalo Frizo , Thaisa B. Pickler, Denise Grotto, Marli Gerenutti

Laboratory for the Toxicological Research (Lapetox), University of Sorocaba, Sorocaba, São Paulo, Brazil

Available online 22 August 2014



Show less

Choose an option to locate/access this article:

Check if you have access
through your login credentials
or your institution

[Check access](#)



Purchase \$35.95

[Get Full Text Elsewhere](#)

doi:10.1016/j.reprotox.2014.07.034

[Get rights and content](#)

Corresponding author.

Copyright © 2014 Published by Elsevier Inc.

ANEXO O – Certificado de participação como examinador na banca “Shiitake como nutracêutico: Avaliação da segurança do seu consumo *in vivo* através de parâmetros hematológicos”



UNISO

*Certificamos que Profa Dra. Denise Grotto (orientadora), Profa. Dra. Edilma Maria de Albuquerque Vasconcelos e Farmacêutica Thaisa Borim Pickler participaram como examinadoras na Banca de Avaliação Final do trabalho de Prática de Pesquisa III dos (as) alunos (as) Camila de Vivo Gonçalves e Gabrielle Pereira Neves Sakamuta intitulado: “SHIITAKE COMO NUTRACÊUTICO: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO SEU CONSUMO *in vivo* ATRAVÉS DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS” ocorrida no dia 04/11/2014, no curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba.*

Curso de Farmácia
Certificado registrado eletronicamente



Sorocaba, 04 de novembro de 2014

Prof.ª M. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia

ANEXO P – Certificado de participação como examinador na banca “Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de frutas usualmente consumidas pela população”



Certificado

*Certificamos que Profa Dra. Denise Grotto (orientadora), Profa. Dra. Edilma Maria de Albuquerque Vasconcelos e Farmacêutica Thaisa Borim Pickler participaram como examinadoras na Banca de Avaliação Final do trabalho de Prática de Pesquisa III do (a) aluno (a) **Amanda Bentivoglio Silveira** intitulado: **“AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE FRUTAS USUALMENTE CONSUMIDAS PELA POPULAÇÃO”** ocorrida no dia 04/11/2014, no curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba.*

Curso de Farmácia
Certificado registrado eletronicamente



Sorocaba, 04 de novembro de 2014

*Prof. M. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia*