



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

ESTUDO TOXICOLÓGICO NÃO CLÍNICO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Spondias mombin* L.

ELIADNA DE LEMOS VASCONCELOS SILVA

Recife

2015

ELIADNA DE LEMOS VASCONCELOS SILVA

**ESTUDO TOXICOLÓGICO NÃO CLÍNICO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Spondias mombin* L.**

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

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Alice Valença Araújo

Recife

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

S586e Silva, Eliadna de Lemos Vasconcelos.
Estudo toxicológico não clínico do extrato hidroalcoólico de *Spondias mombin* L. / Eliadna de Lemos Vasconcelos Silva. – Recife: O autor, 2015.
75 f. il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.
Inclui referências.

1. Plantas medicinais. 2. Extratos vegetais. 3. *Spondias mombin*. 4. Toxicidade. 5. Compostos fenólicos. I. Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-073)

ELIADNA DE LEMOS VASCONCELOS SILVA

**ESTUDO TOXICOLÓGICO NÃO CLÍNICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Spondias mombin L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 24/02/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Presidente e Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Germana Freire Rocha Caldas (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Maranhão

Dr. Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho (Examinador Externo)
Centro Universitário do Vale do Ipojuca

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

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

*Aos meus pais José Eraldo da Silva e
Laudicéia de Lemos Vasconcelos Silva, por
toda dedicação em me proporcionar uma boa
educação e por serem os principais
incentivadores do meu desenvolvimento. Amo
vocês!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem o qual nada seria possível, pela presença constante em minha vida, por me capacitar a alcançar meus objetivos e pela dádiva de mais uma conquista.

Aos meus pais por todo amor, apoio, incentivo, investimento, dedicação e compreensão sempre presentes durante toda a minha vida. Obrigada por tudo!

Aos meus irmãos Elidiane Lemos, Elidiel Lemos e Elielton Lemos, por toda ajuda, apoio, incentivo e convívio salutar. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley, pela oportunidade, por me receber em seu laboratório, pela confiança, por toda atenção e pela orientação concedida neste trabalho. Obrigada!

A Prof^a. Dr^a. Alice Valença Araújo, por todos os ensinamentos, pela indispensável orientação, por toda ajuda e amizade.

Aos professores: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva-Neto e Prof^a. Dr^a. Larissa Araújo Rolim pelas colaborações no trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Stella Regina Zamuner, pela oportunidade de conhecimento e ingresso na área científica durante a graduação, por todos os ensinamentos, orientação, confiança, incentivo, pela amizade e pelo grande exemplo de pessoa, de excelência, dedicação e amor à profissão. Muito obrigada por tudo!

Aos meus familiares, por serem sempre tão presentes, pelo incentivo, apoio e compreensão em todos os momentos em que eu estive ausente.

Aos amigos da pós-graduação em Ciências Farmacêuticas: Paulo Nunes, Marjorie Denti, Samara Brito, Anita Oliveira e Cynthia Layse pela indispensável ajuda durante os experimentos, por toda troca de conhecimentos, pela convivência salutar e pela grande amizade. Muito obrigada a todos!

A todos que fazem o Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Bioativos da UFPE, pelo convívio e colaboração. Em especial, aos alunos de iniciação científica, Alisson Rodrigo e Joanellys Lima por toda caminhada juntos, pela dedicação e companheirismo. Vocês vão longe!

Aos amigos da pós-graduação: Rafaela Ferreira (Rafa), Juliano Silva, Allan Chernichiarro, Simone Santos, Charles Mendes, Cristiane Lima, Danilo Araújo e Conceição (Ceça), pelos bons momentos de convivência, pelo desenvolvimento das disciplinas em conjunto e pela amizade.

Aos colegas do Depto. de Fisiologia e Farmacologia, a veterinária Cláudia Oliveira pela ajuda com os animais, ao Sr. Fredson pela boa companhia e por ser sempre solícito e a Rose pela boa companhia e simpatia.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas que contribuíram para minha formação e funcionários em geral, em especial a Nerilin Trajano pelo ótimo atendimento e boa disposição em ajudar sempre. Obrigada!

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

RESUMO

Spondias mombin L., Anacardiaceae, é cultivada em várias partes do mundo e tradicionalmente é utilizada para o tratamento de várias doenças, por apresentar propriedades medicinais. Os extratos de suas folhas apresentam atividades farmacológicas reconhecidas tais como, antimicrobiana, antiviral, leishmanicida, antioxidante, anticonvulsivante, antipsicótica, antihelmíntica e anti-inflamatória. Na medicina popular, as folhas de *Spondias mombin* também têm sido utilizadas para indução de aborto. Em nossa revisão bibliográfica, constatamos carência de informações toxicológicas detalhadas sobre a espécie. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a segurança do uso do extrato hidroalcoólico de *Spondias mombin* (EHS_m) em ratos Wistar de ambos os sexos, visando dar suporte a futuros testes clínicos. Inicialmente foram caracterizados os constituintes químicos do EHS_m por CLAE-DAD e foram realizados testes de toxicidade aguda (por via oral na dose de 5 g/kg), testes de doses repetidas sobre os parâmetros bioquímico, hematológico e morfológico nas doses de 200, 500 e 2000 mg/kg consecutivas durante 30 dias, além de ensaios de toxicidade reprodutiva, nas mesmas doses administradas durante o período de pré-implantação (1º ao 6º dia) da gestação. A análise por CLAE-DAD do EHS_m demonstrou a ocorrência dos flavonoides: quercetina, canferol e isoquercetina, além do polifenol resveratrol. Os resultados obtidos mostraram que por via oral o EHS_m não provocou mortes na dose de 5 g/kg nos animais. O tratamento de doses repetidas com o EHS_m não produziu sinais significativos de toxicidade ou mortes, o consumo de água não foi alterado em ambos os sexos e o consumo de ração foi diminuído apenas na primeira semana para os machos tratados na dose de 500 mg/kg, entretanto, o ganho de massa corporal não foi afetado em ambos os sexos durante todo o tratamento. Os perfis bioquímico e hematológico não foram clinicamente modificados e estão dentro dos limites de referência para a espécie. Não foram observadas alterações nas massas absolutas e relativas dos órgãos analisados, bem como na morfologia macroscópica externa dos mesmos. A análise microscópica dos órgãos apontou discreto infiltrado linfocitário no fígado (EHS_m 500 e 2000 mg/kg) de animais de ambos os sexos e discreto aumento do espaço glomerular nos rins das fêmeas (EHS_m 500 e 2000 mg/kg) e machos (todos os grupos tratados) em relação ao grupo controle, contudo tais alterações não apresentam relevância clínica, visto que ocorreram de modo não-generalizado. Ratas prenhes tratadas no período da pré-implantação com EHS_m não apresentaram alterações nos parâmetros reprodutivos, entretanto, o tratamento provocou redução no ganho de massa corporal no período do tratamento. Nenhuma morte e/ou malformações dos fetos foi observada com a dose mais alta sugerindo que o extrato não possui efeito abortivo. Os resultados encontrados nos levam a concluir que o EHS_m não apresentou toxicidade por via oral, entretanto, há indícios de possível toxicidade materna durante o período de pré-implantação, que deve ser analisada posteriormente em maior detalhe.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Extratos vegetais. *Spondias mombin*. Toxicidade. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

Spondias mombin L., Anacardiaceae, is cultivated in several parts of the world and traditionally is used for treatment of several diseases, for presenting medicinal properties. The extracts of the leaves have recognised pharmacological activities such as antimicrobial, antiviral, leishmanicidal, antioxidant, anticonvulsant, antipsychotics, anthelmintic and anti-inflammatory. In folk medicine, the leaves of *Spondias mombin* have also been used to induce abortion. In our bibliographical review, we verified a lack of detailed toxicological information about the species. In this sense, the aim of the present study was evaluate the safety of use of hydroalcoholic extract of *Spondias mombin* (HESm) in Wistar rats of both sexes, in order to support future clinical trials. Initially were characterized the chemical constituents of the HESm by HPLC-DAD and it were accomplished the acute toxicity test (by oral route in dose of 5 g/kg), tests of repeated doses on biochemical, hematological and morphologic parameters in doses of 200, 500 and 2000 mg/kg consecutives during 30 days, as well as reproductive toxicity tests in the same doses administered during the pre-implantation period (1st to 6th day) of gestation. The analysis by HPLC-DAD of the HESm demonstrated the occurrence of flavonoids: quercetin, kaempferol and isoquercetin, besides the polyphenol resveratrol. The results obtained showed that orally the HESm not caused deaths at a dose of 5 g/kg in animals. Treatment of repeated doses with the HESm did not produce significant signs of toxicity or death, the water intake has not changed in both sexes and food intake was reduced only in the first week for males treated in dose of 500 mg/kg, however, body weight gain was not affected in both sexes throughout the treatment. Biochemical and Hematological profiles were not clinically modified and are within the limits of reference to the species. Alterations were not observed on absolute and relative weight of organs analyzed, as well as in external macroscopic morphology of the same. Microscopic analysis of the organs showed discrete lymphocytic infiltrate in the liver (HESm 500 and 2000 mg/kg) of both sexes and discrete increased glomerular space in the kidney of females (HESm 500 e 2000 mg/kg) and males (all treated groups), compared to the control group, however these changes do not present clinical relevance, since it occurred in a non-generalised. Pregnant rats treated in the pre-implantation period with HESm not showed alterations in reproductive parameters, however the treatment caused reduction in body weight gain during the period of treatment. No death and/or malformations of fetuses was observed with the highest dose suggesting that the extract does not have abortifacient effect. Based on our results, we conclude that HESm did not present oral toxicity, however there are indications of possible maternal toxicity during the pre-implantation period, which should be examined in greater detail later.

Keywords: Medicinal plants. Plant extracts. *Spondias mombin*. Toxicity. Phenolic Compounds.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 –** *Spondias mombin* L. (A), suas flores, folhas (B) e frutos (C)..... 25
- Figura 2 –** Estrutura química de flavonoides identificados no extrato hidroetanólico das folhas e frutos de *Spondias mombin* L. 26

RESULTADOS

- Figura 3 –** Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) detectado a 340 nm. Picos e Tempo de retenção (Tr): isoquercetina (Tr=5,2 min), resveratrol (Tr=12,8 min), quercetina (Tr=15,5 min) e canferol (Tr=21,2 min)..... 37
- Figura 4 –** Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) por via oral sobre o ganho de massa (g) em ratos Wistar adultos machos (A) e fêmeas (B) tratados por 30 dias consecutivos..... 39
- Figura 5 –** Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm) no consumo de água (A) e ração (B) em ratos Wistar machos tratados por via oral durante 30 dias consecutivos..... 40
- Figura 6 –** Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm) no consumo de água (A) e ração (B) em ratas Wistar tratadas por via oral durante 30 dias consecutivos..... 41
- Figura 7 –** Cortes histológicos do fígado (HE, ampliação 100x) de ratos Wistar machos (A) e fêmeas (B) tratados oralmente por 30 dias consecutivos com água potável (Controle, A1 e B1), EHSm 200 mg/kg (A2, B2), 500 mg/kg (A3, B3) e 2000 mg/kg (A4, B4)..... 49
- Figura 8 –** Cortes histológicos do rim (HE, ampliação 100 e 200x) de ratos Wistar machos (A) e fêmeas (B) tratados oralmente por 30 dias consecutivos com água potável (Controle, A1 e B1), EHSm 200 mg/kg (A2, B2), 500 mg/kg (A3, B3) e 2000 mg/kg (A4, B4)..... 50
- Figura 9–** Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm) no consumo de ração em ratas Wistar prenhes tratadas por via oral durante o período de pré-implantação (1^o ao 6^o dia)..... 53

Figura 10— Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm) no consumo de água em ratas Wistar prenhes tratadas por via oral durante o período de pré-implantação (1º ao 6º dia). Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n=6/grupo)..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Gradiente de fase móvel utilizado na análise do EHSm por CLAE.....	31
Tabela 2–	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos.....	43
Tabela 3–	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas tratadas por 30 dias consecutivos.....	44
Tabela 4–	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar tratados por 30 dias consecutivos.....	45
Tabela 5–	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar tratadas por 30 dias consecutivos.....	46
Tabela 6–	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) administrado por via oral sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de ratos Wistar tratados por 30 dias consecutivos.....	47
Tabela 7–	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) administrado por via oral sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de ratas Wistar tratadas por 30 dias consecutivos.....	48
Tabela 8–	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) administrado por via oral sobre os indicadores reprodutivos durante o período de pré-implantação (1º ao 6º dia) da prenhez em ratas Wistar.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Estudos toxicológicos não clínicos de plantas medicinais.....	19
2.1.1 Toxicidade aguda.....	20
2.1.2 Toxicidade de doses repetidas	20
2.2 Toxicologia do desenvolvimento.....	21
2.2.1 Teratogênese e embriofetotoxicidade.....	22
2.3 Estudos sobre <i>Spondias mombin</i> L.	23
2.3.1 Botânico.....	23
2.3.2 Fitoquímico.....	25
2.3.3 Etnofarmacológico.....	27
2.3.4 Farmacológico.....	27
2.3.5 Toxicológico.....	28
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Geral.....	30
3.2 Específicos.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS:	31
4.1 Material botânico.....	31
4.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	31
4.3. Animais.....	32
4.4 Toxicidade aguda.....	32
4.5 Toxicidade oral de doses repetidas.....	32
4.6 Parâmetros hematológicos.....	33
4.7 Parâmetros bioquímicos.....	33
4.8 Análise morfológica.....	33

4.9 Toxicidade reprodutiva.....	34
4.10 Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	37
5.2 Toxicidade aguda.....	38
5.3 Toxicidade oral de doses repetidas.....	38
5.4 Parâmetros hematológicos.....	42
5.5 Parâmetros bioquímicos.....	42
5.6 Análise morfológica.....	42
5.7 Toxicidade reprodutiva.....	51
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO.....	61
8. REFERÊNCIAS.....	63

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Substâncias de origem vegetal têm sido utilizadas desde os tempos antigos como fontes para o tratamento de doenças (LOACES et al., 2001). Cerca de 85% da população dos países em desenvolvimento utiliza plantas para fins medicinais, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). Com isso, as preparações farmacêuticas, conhecidas como medicamentos fitoterápicos, contendo extratos padronizados de uma ou mais plantas, ganham uma grande importância.

No Brasil, o uso de plantas na medicina tradicional inclui desde a utilização da planta fresca até o uso dos medicamentos fitoterápicos (CARVALHO et al., 2007). Historicamente, o tratamento farmacológico das doenças e a produção de medicamentos originaram-se a partir do uso de plantas medicinais e grande parte dos fármacos utilizados na terapêutica é derivada das plantas (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

Ainda que nas espécies vegetais observe-se um alto potencial terapêutico, uma atenção especial deve ser dada a uma série de efeitos indesejáveis que podem surgir decorrente do uso indiscriminado, inclusive danos a órgãos vitais. Muitas plantas que são utilizadas para fins medicinais possuem substâncias potencialmente nocivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (FERREIRA; PINTO, 2010). Diante disso, estudos de segurança de uso são extremamente importantes.

Apesar disso e mesmo diante do grande número de plantas utilizadas durante os milhares de anos, a quantidade de plantas medicinais estudadas sob a óptica da farmacologia e toxicologia, com o objetivo de comprovação de seu uso popular e segurança, ainda é pequeno (FERREIRA, 1998).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 14/2010, estabelecida pela ANVISA, regulamenta o registro de fitoterápicos determinando os aspectos essenciais ao registro, tais como a identificação botânica das espécies vegetais usadas, padrão de qualidade, identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas.

O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do governo federal brasileiro foi instituído em 2008 com o objetivo de garantir o uso racional e a segurança do uso de plantas medicinais e fitoterápicos, atribuído ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do complexo produtivo da saúde. A biodiversidade como fonte de novos medicamentos é um interesse em crescimento das indústrias

farmacêuticas (CORDELL, 1995). As maiores indústrias mundiais do ramo possuem programas de pesquisa na área de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

Nesse contexto, a avaliação do potencial terapêutico e toxicológico das plantas medicinais, assim como de seus metabólitos secundários isolados, é fundamental para a obtenção de medicamentos fitoterápicos eficazes e seguros.

O extrato das folhas de *Spondias mombin* L. possui inúmeras atividades farmacológicas comprovadas cientificamente, como: antiviral e antimicrobiana (CORTHOUT et al., 1991, 1992 e 1994; COATES et al., 1994; ABO et al., 1999; SILVA et al., 2012), leishmanicida (ACCIOLY, 2001), antioxidante (TIBURSKI et al., 2011; SILVA et al., 2012), anticonvulsivante, antipsicótica e ansiolítica (AYOKA et al., 2005 e 2006), anti-helmíntica (ADEMOLA et al., 2005) e anti-inflamatória (NWORU et al., 2011).

Entretanto, apesar dos inúmeros estudos farmacológicos existentes, ainda há pouco conhecimento sobre a potencial toxicidade *in vivo* de *S. mombin*, justificando a necessidade de estudos adicionais a fim de garantir a segurança de seu uso.

2. Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estudos toxicológicos não clínicos de plantas medicinais

Pode-se definir a toxicologia de uma substância como a capacidade de causar dano grave ou morte a um dado organismo (DRAIZE et al., 1944). Para que isto ocorra é preciso que haja uma interação entre o agente nocivo e o organismo vivo levando a modificações que podem ser reversíveis ou não, com efeito molecular, celular ou tissular e que podem até causar a morte do indivíduo (LOOMIS; HAYES, 1996).

A avaliação toxicológica de uma substância compreende o estudo dos dados toxicológicos de uma substância a fim de classificá-la toxicologicamente, fornecendo informações sobre a forma concreta de sua utilização, bem como as medidas preventivas e curativas quando do uso inadequado (TAHRAOUI et al., 2010).

Toda substância química pode ser um agente tóxico em potencial, dependendo da dose administrada, do tempo de exposição, frequência ou via de administração (CASTRO, 1993). Porém, do ponto de vista toxicológico, caso mantenham-se as condições de exposição abaixo dos níveis de tolerância, tais substâncias podem ser seguras (BOELSTERLI, 2003).

Os testes toxicológicos são realizados para se obter dados sobre as condições em que as substâncias produzem efeitos tóxicos, desde natureza desses efeitos a quais os níveis seguros de sua exposição (LOOMIS; HAYES, 1996).

A obtenção de dados toxicológicos em seres humanos é bastante limitada por motivos éticos, morais e legais. Diante disso, as informações toxicológicas sobre os compostos químicos são obtidas basicamente a partir de testes toxicológicos não clínicos, ou seja, com animais de laboratórios em condições previamente padronizadas (MORTON, 1998; BOELSTERLI, 2003), que podem ter valor de aplicação na espécie humana, desde que sejam realizados sob condições adequadas e que seja feita a escolha apropriada da linhagem animal e espécie, além da via de administração e dosagens (MORTON, 1998).

A ampla utilização das plantas como medicamentos tem apontado dados de que as plantas medicinais não são tão seguras como frequentemente são vistas. Várias substâncias provenientes do reino vegetal apresentam elevada toxicidade, como a estricnina, digitoxina, cocaína, entre outras. O medicamento fitoterápico é um corpo estranho ao organismo e, como todo xenobiótico, os produtos de sua biotransformação

são potencialmente tóxicos e assim devem ser encarados até que se prove o contrário (LAPA et al., 2000).

2.1.1 Toxicidade aguda

O primeiro teste toxicológico a ser realizado com um produto novo é o estudo de toxicidade aguda, que tem o objetivo de avaliar os efeitos tóxicos detectados após a administração de um agente em dose única ou múltipla em 24 horas (OECD, 2001), a fim de determinar a sintomatologia em curto prazo após a administração de um composto, e também seus efeitos durante 14 dias após a administração (LARINI; OLIVEIRA, 1993). É recomendado o uso da mesma via de administração utilizada para os humanos, sendo a via oral a mais usada (KLAASSEN et al., 1996).

Para a realização dos testes de toxicidade aguda são comumente utilizados camundongos e ratos, embora em certos casos também se utilizem animais maiores, como coelhos e cães. Nesse estudo, as informações obtidas devem ser usadas em estudos subsequentes de toxicidade prolongada (LOOMIS; HAYES, 1996).

2.1.2 Toxicidade de doses repetidas

O estudo toxicológico de doses repetidas avalia a toxicidade de um produto a partir da administração de doses diárias. Esta avaliação toxicológica tem como principal objetivo estabelecer os níveis nos quais não mais se observam efeitos tóxicos, identificar e caracterizar os órgãos afetados, bem como o grau de comprometimento dos mesmos (TAHRAOUI et al., 2010).

A via oral constitui a principal via de administração nesse tipo de teste. Os animais necessitam ser saudáveis e estar em idade adulta jovem. A exposição tende a ser em pequenas quantidades de uma substância por um longo período de tempo, o que com frequência provoca o lento acúmulo das concentrações do composto no organismo. A avaliação dos efeitos tóxicos cumulativos vem sendo objeto de estudos por causa da exposição a doses repetidas em baixas concentrações de diversas substâncias químicas naturais e sintéticas do ambiente (OECD, 2009).

Durante o estudo, é necessário que haja observação diária do animal quanto a alterações de massa corporal, cor e textura dos pêlos, consumo de água e ração, temperatura corporal, parâmetros respiratórios e cardiovasculares e quanto a mudanças no comportamento e presença de anormalidades motoras (BARNES; DOURSON, 1988).

Ao final do tratamento, são retiradas amostras sanguíneas dos animais para a realização de análises hematológicas e bioquímicas. Em seguida, os principais órgãos são removidos e avaliados quanto as suas características anatomopatológicas. O valor dos resultados obtidos em um teste toxicológico é significativamente aumentado pelo exame detalhado de cada animal, como também pela observação do tempo e das doses para que ocorra sua morte ou recuperação.

2.2. Toxicologia do desenvolvimento

O desenvolvimento normal do embrião, após a fecundação, depende tanto de um ambiente intrauterino favorável quanto de uma herança genética adequada. A ingestão de certos compostos antes e durante a gestação pode provocar danos embrionários (SILVA, 2004).

O consumo de medicamentos durante a gravidez é bastante comum. Até o início da década de 1960, os estudos envolvendo os possíveis efeitos nocivos das drogas sobre a gravidez e o conceito não eram realizados de maneira adequada. Em 1962, mais de 10.000 crianças no mundo inteiro nasceram com graves malformações nos membros decorrentes do consumo por gestantes da talidomida, indicada como sedativo e anti-emético. Diante disso, pesquisas com a toxicologia do desenvolvimento se tornaram imprescindíveis e de rotina no estudo da segurança de substâncias químicas (CLARK, 1993; WEBSTER; FREEMAN, 2001).

Após o acontecimento com a talidomida, a toxicologia do desenvolvimento se consolidou como ciência e assumiu um importante papel na avaliação da segurança de medicamentos e produtos químicos. Trata-se do estudo dos efeitos tóxicos no organismo em desenvolvimento ocorrendo durante a vida do organismo que se submete à exposição de substâncias antes da concepção e/ou durante o desenvolvimento pré ou pós-natal (SCHWETZ et al., 1991).

Durante o desenvolvimento, os efeitos tóxicos das drogas podem promover a morte do embrião, malformações congênitas (teratogênese), retardo no desenvolvimento intrauterino e/ou deficiência funcionais. As drogas também podem provocar efeitos perniciosos no sistema reprodutor de indivíduos adultos, bloqueando a gametogênese, evitando a ovulação, fertilização ou implantação do embrião (SCHWETZ et al., 1991; BECKMAN, 1997).

2.2.1 Teratogênese e embriofetotoxicidade

A possibilidade de malformações congênitas, retardo no desenvolvimento e embriofetoletalidade compreendem os maiores e mais sérios riscos associados com a exposição a drogas durante a gestação. Os agentes capazes de promover malformações congênitas são chamados teratogênicos, enquanto aqueles que produzem retardo no desenvolvimento, variações na ossificação ou morte do conceito, mas não promovem malformações são conhecidos como embriofetotóxicos (WEBSTER; FREEMAN, 2001).

Os efeitos nocivos das drogas podem ser promovidos pela ação direta sobre o feto ou indireta, através da ação tóxica sobre o organismo materno (MENEGOLA et al., 1998). A gravidade desses efeitos está diretamente relacionada com o período da gestação, a dose ou exposição, diferenças entre as espécies, fatores genéticos e toxicocinéticos, como metabolismo, transporte placentário e via de administração. Cerca de 2-4% das malformações são espontâneas e menos de 1% são induzidas pelo uso de medicamentos. O percentual aumenta se o abuso de drogas, o tabaco e o álcool forem incluídos (BRENT et al., 1993, WEBSTER; FREEMAN, 2001).

O período da gestação pode ser dividido em 3 fases de acordo com a sensibilidade aos agentes teratogênicos e embriofetotóxicos. A fase inicial da gestação compreende o período de pré-implantação, desde a fecundação até a implantação do blastocisto. Na mulher, esse período compreende o intervalo até o 17º dia de gestação, enquanto que em ratos e camundongos, aproximadamente até o 6º dia (FRITZ; GIESE, 1990). Neste período, o embrião encontra-se com células totipotentes, em divisão, sem que haja acréscimo citoplasmático (FRITZ; GIESE, 1990; ALMEIDA et al., 2000). Esse intervalo inicial da gestação é de grande importância, pois a exposição materna a agentes químicos neste período pode provocar a embrioletalidade, como também não interferir com o desenvolvimento do embrião (WILSON et al. 1953; WILSON; FRASER, 1977); (BRENT et al. 1993). O fato de não interferir no desenvolvimento do embrião se deve ao alto grau de indiferenciação e capacidade de divisão das células do embrião, que quando possível promovem a reposição das células mortas, sem que haja comprometimento do desenvolvimento do embrião.

Entretanto, outros autores afirmam que certas injúrias nesse estágio podem resultar em malformações ou retardos no desenvolvimento (GENEROSO et al., 1988; GIAVINI et al., 1990). Drogas como a ciclofosfamida, nicotina e adriamicina são capazes de promover deficiência no ganho de peso e embrioletalidade quando administradas

durante o período de pré-implantação em ratas (FABRO et al., 1984; GIAVINI et al., 1990).

Após a implantação, o embrião inicia o período de organogênese, que na espécie humana vai do 18° ao 40° dia de gestação e em ratos correspondente ao período entre o 7° ao 14° dia de gestação. Esse período é caracterizado por uma intensa proliferação e migração celular, remodelamento tissular e formação rudimentar das estruturas do corpo (BRENT et al., 1993).

Após a organogênese, inicia-se o período fetal, caracterizado por diferenciação e crescimento tissular, maturação fisiológica dos diferentes sistemas e crescimento ponderal do feto (FRITZ; GIESE, 1990). A sensibilidade frente a malformações anatômicas é extremamente baixa neste período, porém ainda pode-se provocar morte celular e inibição da diferenciação e divisão celular. Tais alterações podem interferir com a formação dos sistemas nervoso, endócrino e imunológico, promovendo desordens funcionais e de comportamento (AUROUX, 1997).

Os parâmetros toxicocinéticos são importantes para determinar o grau de embriofetotoxicidade de uma substância. Quando se quer analisar os riscos de um agente em estudo, a placenta é de extrema importância por se localizar entre a mãe e o embrião ou feto e ser uma estrutura responsável pela troca de substâncias entre ambos. A placenta atua como uma barreira seletiva, podendo funcionar como um reservatório para drogas, que dependendo do tipo, têm a capacidade de atravessá-la. As drogas podem causar necrose placentária, redução do fluxo sanguíneo ou inibição da passagem de nutrientes pela placenta (SILVA et al., 2009).

As drogas que atravessam a placenta são semelhantes as que atravessam a barreira hematoencefálica, isto é, são lipofílicas, não-polares e de tamanho não superior a 1000 Å (ADLER, 1994). O etanol, a nicotina, cocaína, salicilatos e metais pesados são tóxicos para a placenta e conseqüentemente para o ser em formação.

2.3 Estudos sobre *Spondias mombin* L.

2.3.1 Botânico

A família Anacardiaceae é formada por cerca de 76 gêneros com 600 espécies. A distribuição geográfica das anacardiáceas é ampla, estando presente em ambientes secos a úmidos, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais, além das regiões temperadas em todo o mundo (PELL, 2011). No Brasil, foram catalogados 14

gêneros de Anacardiaceae com 57 espécies, dentre as quais 14 são restritas ao Brasil (SILVA-LUZ; PIRANI 2010).

Sistematicamente, o gênero *Spondias* pertence à família Anacardiaceae. Trata-se de um gênero tropical com aproximadamente 18 espécies, dentre estas, cerca de 8 espécies são encontradas nas Américas. É um gênero economicamente importante devido ao seu potencial valor comercial, com frutos que são comercializados *in natura* ou processados na forma de produtos alimentícios (MITCHELL, 1998), além de apresentar considerável uso popular na medicina tradicional (AGRA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2010; LUCENA et al., 2012).

Quanto à classificação taxonômica, a espécie *S. mombin* apresenta a seguinte posição: Domínio Eukarya; Reino Plantae; Filo Anthophyta; Divisão Spermatophyta; Subdivisão Angiospermae; Classe Eudicotyledoneae; Subclasse Archichlamidae; Ordem Sapindales; Família Anacardiaceae; Tribo Spondiadeae e Gênero *Spondias* L. Esta classificação botânica foi realizada em 1753 pelo botânico Carolus Linnaeus (BARROSO et al., 1999).

Spondias mombin L. é encontrada na América tropical, em algumas partes da Ásia, no oeste da Índia e em partes da África, incluindo Gana (THOMAS, 1974; AYOKA et al., 2006). No Brasil, tem ampla distribuição nas regiões Norte e Nordeste, principalmente nas regiões da Mata Atlântica e da Amazônia, além da Caatinga (BOSCO et al., 2000). Na região do Nordeste é popularmente conhecida por cajá, no Sudeste por cajazeira miúda ou cajá pequeno, no Sul do Brasil é vulgarmente conhecida por cajazeira ou cajá mirim e na Amazônia por taperebá.

S. mombin é uma árvore frutífera frondosa e perene, de porte alto que pode chegar a 30 m de altura, com folhas caducas e um tronco de 60-75 cm de largura, revestido por casca grossa e rugosa (LORENZI, 1992; ALVES et al., 2000). As folhas possuem de 5 a 11 folíolos possuindo de 9-11 cm e as flores são pequenas, brancas e aparecem em cachos na extremidade dos ramos. O fruto, uma drupa, é amarelado e possui de 2-4 cm de comprimento e de 1,5-2 cm de largura, possui mesocarpo carnoso de sabor agri-doce (BARROSO et al., 1999). O endocarpo é branco, enrugado e possui de 2 a 5 lóculos (SACRAMENTO e SOUZA, 2000). (Figura 1).



Figura 1. *Spondias mombin* L. (A), suas flores, folhas (B) e frutos (C).

Fontes: <http://www.rain-tree.com/Plant-Images/ubos-pic.htm>

<http://www.arvores.brasil.nom.br/new/cajamirim/index.htm>

2.3.2 Fitoquímico

Estudos fitoquímicos realizados com as folhas de *Spondias mombin* confirmaram a presença de taninos, saponinas, antraquinonas glicosiladas, alcalóides (CORTHOUT et al. 1991; ABO et al., 1999; NJOKU; AKUMEFULA, 2007; SILVA et al. 2011), triterpenos (FRED-JAIYESIMI et al., 2009) e flavonoides (NJOKU e AKUMEFULA, 2007; SILVA et al. 2012). Ayoka et al. (2006) também reporta, além desses compostos, a presença de glicosídeos no extrato bruto aquoso e metanólico da planta.

A quantificação do teor fitoquímico das folhas de *S. mombin* foi realizada por Njoku e Akumefula (2007), evidenciando um teor de saponinas (7,60%), alcalóides (6,00%), taninos (3,82%), flavonoides (3,00%) e compostos fenólicos (1,00%). Os estudos com a casca do caule também identificaram esses mesmos compostos fitoquímicos além da presença de quinonas e terpenos (DIBY et al., 2012).

Quanto aos compostos isolados, em estudo realizado por Corthout et al. (1991) foi reportada a presença de geranina e galoilgeranina, dois elagitaninos identificados nas folhas e caules de *S. mombin*. Em estudo subsequente, Corthout et al. (1992) mostraram a presença do éster butírico do ácido clorogênico e do ácido 2-O-cafeoil-(+)-alohidroxicítrico (um éster do ácido cafêico). No extrato etanólico das folhas e caules de *S. mombin* foi identificada a presença de ácidos do tipo 6-aquil-salicílico (CORTHOUT et al., 1994). Fred-Jaiyesimi et al. (2009) isolaram do extrato metanólico das folhas de *S. monbin* o triterpeno 3 β -urs-12-en-3-il(9z)-hexadec-9-enoato.

Silva et al. (2012), ao realizar estudo com o extrato hidrometanólico das folhas da cajazeira, identificaram a presença do flavonóide quercetina e do ácido elágico. Em outro estudo fitoquímico do extrato hidroetanólico das folhas da planta foram identificados os flavonoides: quercetina, canferol e isoquercetina, além da presença do flavonóide rutina no extrato hidroetanólico dos frutos da planta (CABRAL, 2014). (Figura 2).

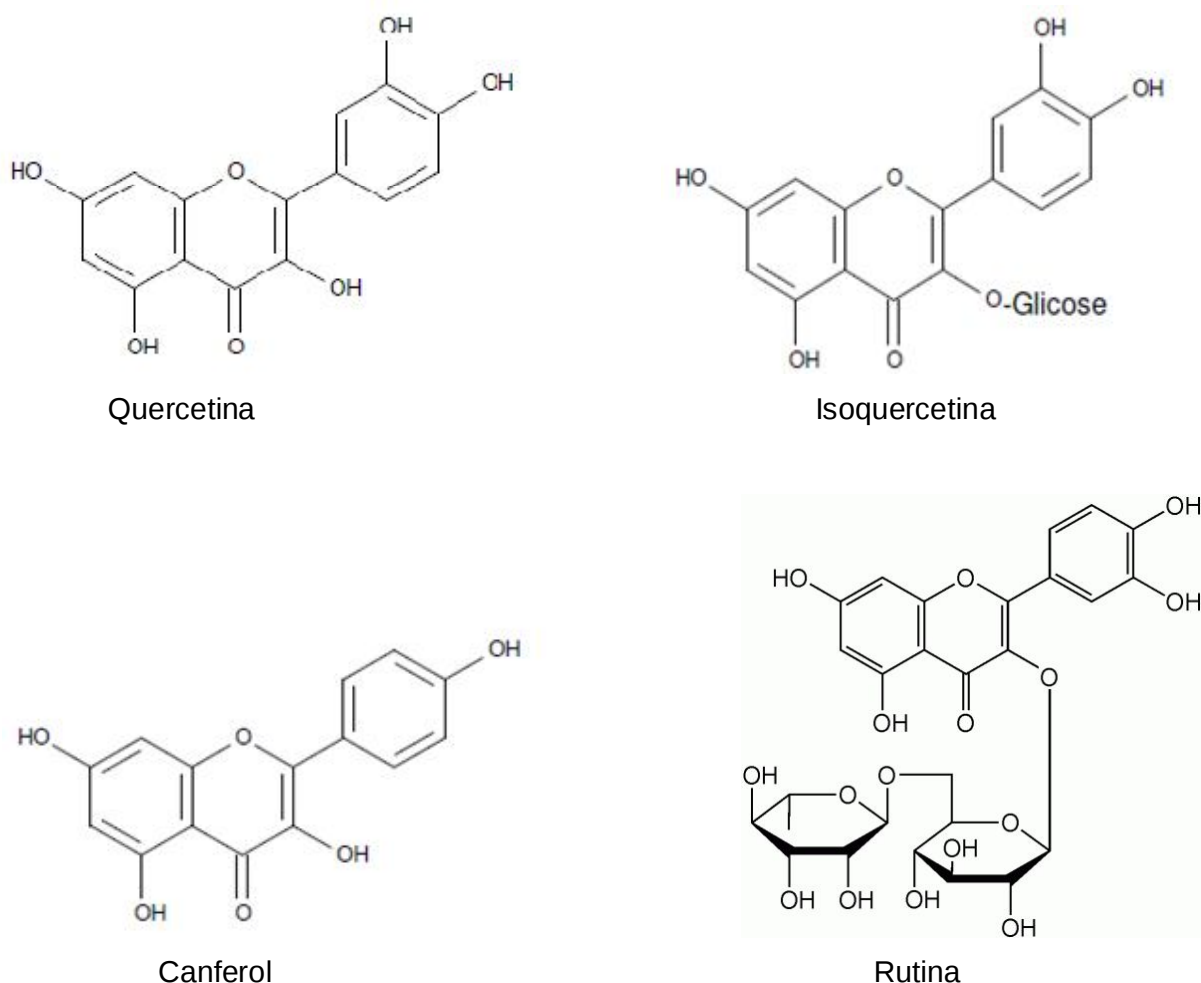


Figura 2. Estrutura química de flavonoides identificados no extrato hidroetanólico das folhas e frutos de *Spondias mombin* L. (CABRAL, 2014).

Os frutos de *S. mombin* são ricos em carotenóides, vitaminas A e C (BARROSO et al., 1999), contendo como principal carotenóide a β -criptoxantina, seguido da luteína (HAMANO; MERCADANTE, 2001). De acordo com Njoku e Akumefula (2007), as folhas de *S. mombin* são ricas em vitaminas C, B1, B2 e B3 e as análises minerais revelaram a presença de potássio, magnésio, sódio, cálcio e fósforo nas folhas.

2.3.3 Etnofarmacológico

Tradicionalmente *Spondias mombin* é utilizada para o tratamento de várias doenças, por suas cascas, ramos e folhas apresentarem propriedades medicinais (SACRAMENTO; SOUZA 2000). A literatura etnofarmacológica descreve o uso das raízes para problemas de estômago e a casca do caule de *S. mombin* é usada popularmente como abortiva, com efeito emético, como antídoto para toxina de serpentes e para o tratamento de feridas (TROPICOS, 2013; VILLEGAS et al., 1997).

As folhas e cascas do caule são utilizadas na medicina popular para o tratamento de desordens infecciosas possuindo propriedades antidisentérica. As folhas também são usadas como anti-inflamatórias para problemas da boca, garganta, herpes labial, além do uso reportado para o tratamento de prostatite, uretrite, cistite, conjutivite, tumores e depressão (ALBUQUERQUE et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008; TROPICOS, 2013). Além destas atividades, o uso das folhas foi reportado como estimulante uterino, para o controle da ansiedade e com atividade antifecundadora (OFFIAH; ANYANWU, 1989; AYOKA et al., 2005; UCHENDU; ISEK 2008).

Popularmente o uso das folhas também é relatado para o tratamento de infecções bacterianas, virais e fúngicas, além de ser eficaz contra parasitas intestinais. A atividade antifúngica de *S. mombin* é comumente utilizada na medicina tradicional, porém alguns estudos não reportaram nenhuma atividade desse extrato sobre os fungos (ABO et al., 1999; AJAO et al., 1995).

2.3.4 Farmacológico

Os extratos das folhas e cascas do caule de *S. mombin* apresentaram atividade antiviral contra *Coxsachie* e *Herpes simplex*, tal propriedade foi atribuída à presença dos elagitatinos, geraniina e galiolgeraniina (CORTHOUT, et al. 1991). Esta atividade antiviral também foi atribuída aos compostos ácido 2-o-cafeicol-(+)-alohidroxicítrico e éster butírico de ácido clorogênico, isolados das folhas e cascas de *S. mombin* (CORTHOUT et al., 1992). O ácido elágico e quercetina, compostos isolados das folhas de *S. mombin* mostraram potencial atividade contra o vírus da dengue tipo 2 (SILVA et al., 2011).

A atividade vermífuga dos extratos etanólico e aquoso de *S. mombin* foi confirmada em estudos com ovelhas, relatando uma redução nos ovos fecais de *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.*, *Oesophagostomum spp.*, *Strongyloides spp.* e *Trichuris spp.* (ADEMOLA et al., 2005). Também foi comprovado cientificamente, o

efeito antibacteriano de amplo espectro do extrato das folhas de *S. mombin*, apresentando ação semelhante à ampicilina e gentamicina (ABO et al. 1999). Esta atividade foi atribuída aos compostos isolados de cadeia longa derivados do ácido salicílico sendo eficazes contra *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* and *Mycobacterium fortuitum*.

A atividade antimicrobiana também se mostrou eficaz contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Serratia liquefaciens* e *Enterobacter cloacae*, em estudos com o extrato hidrometanólico das folhas de *S. mombin* (ABO et al., 1999; SILVA et al., 2012).

O uso tradicional das folhas para controle da ansiedade foi comprovado cientificamente em estudos com a administração oral dos extratos aquoso, metanólico e etanólico em ratos e camudongos (AYOKA et al., 2005). Os efeitos antiepilépticos e antipsicóticos também foram documentados em ratos e camundongos, a atividade sedativa prolongou o período de sono e melhorou o comportamento dos animais tratados (AYOKA et al. 2006).

Outros estudos com o extrato hidrometanólico das folhas de *S. mombin* reportaram atividade antioxidante da planta por sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e atividade anti peroxidação lipídica (AKINMOLADUN et al., 2010; SILVA et al., 2012).

O extrato metanólico das folhas de *S. mombin*, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, mostrou atividade anti-inflamatória. O pré-tratamento dos ratos com o extrato causou uma significativa inibição do edema de pata induzido por carragenina, resposta que pode se dá através de uma supressão da produção de mediadores pró-inflamatórios e citocinas como TNF- α e iNO (NWORU et al., 2011).

2.3.5 Toxicológico

A incidência de efeitos colaterais geralmente é menor com os produtos fitoterápicos do que com as drogas sintéticas (DREW; MYERS, 1997). Entretanto, a ideia geral de que as drogas vegetais são seguras e livres de efeitos colaterais não é verdadeira (DIMECH, 2003). Alguns constituintes das plantas apresentam alta toxicidade, como os alcalóides pirrolizidínicos, digitálicos, ésteres de forbol, entre outros.

Ayoka et al., (2005) demonstraram que estudos com os extratos aquoso, metanólico e etanólico das folhas de *Spondias monbin* na dose de 5,0 g/kg por via oral, não demonstraram nenhum sinal de toxicidade aguda em ratos Wistar.

Estudos de toxicidade sub-aguda com extrato aquoso das folhas de *S. mombin* nas doses de 300, 1000 e 1500 mg/kg por via oral durante 14 dias não induziram sinais de toxicidade em ratos quanto aos aspectos comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histológicos (HAMENOO et al., 2010).

O extrato aquoso das folhas de *S. monbin* foi reportado como abortivo, capaz de induzir a expulsão da placenta em fêmeas prenhes de ratos e camudongos em tratamento intraperitoneal com as doses de 750 e 1500 mg/kg em todas as fases da gestação, exceto na fase inicial (OFFIAH e ANYANWU, 1989). O possível mecanismo seria a ação nos receptores de estrogênio no músculo uterino, causando contração prolongada neste músculo liso, e alterações nos hormônios esteróides (IGWE et al., 2011; OLOYE et al., 2013).

Estudo com o extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* não reportou a atividade abortiva em ratas prenhes tratadas intraperitonealmente do 8º ao 11º dia de prenhez com a dose de 800 mg/kg (UCHENDU; ISEK, 2008), este mesmo estudo, porém, relatou o efeito anticoncepcional do extrato nas ratas tratadas do primeiro ao quarto dia de prenhez com a mesma dose.

Apesar das folhas de *S. mombin* serem comumente utilizadas na medicina tradicional e seu extrato apresentar vários estudos com atividade farmacológica reconhecida, ainda há pouco conhecimento sobre a potencial toxicidade *in vivo* da planta. Desta forma, são necessários maiores estudos para garantir a segurança de seu uso.

Diante disso, consideramos a hipótese de avaliar a toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Spondias mombin* produzido pela empresa Selachii Indústria e Comércio Importação e Exportação Ltda. – CE, Brasil.

Este estudo pretende estabelecer as bases científicas e avaliar o potencial de toxicidade da planta a fim de garantir a segurança do seu uso.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a toxicidade não clínica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHS_m).

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar os constituintes químicos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L.;
- Avaliar a toxicidade aguda do EHS_m, por via oral, em ratos Wistar de ambos os sexos;
- Avaliar a toxicidade não clínica do EHS_m, mediante tratamento de doses repetidas (30 dias), por via oral, sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar de ambos os sexos;
- Verificar os efeitos do tratamento de doses repetidas (30 dias), por via oral, do EHS_m sobre a morfologia macro e microscópica dos órgãos de ratos Wistar de ambos os sexos.
- Analisar o efeito da administração oral do EHS_m durante o período de pré-implantação da prenhez em ratas Wistar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

O material botânico utilizado foi constituído pelos sólidos totais obtidos das folhas de *Spondias mombin* L. sob a forma EHSm (70 g do material vegetal para 100 mL de solução hidroetanólica 70%), produzido e fornecido pela empresa Selachii Indústria e Comércio Importação e Exportação Ltda. – CE, Brasil. O extrato seco foi mantido à temperatura ambiente até o momento de sua utilização e ressuspensão em água potável para o tratamento dos animais.

4.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os principais marcadores fitoquímicos das amostras de *S. mombin* foram analisados por meio da análise de CLAE-DAD usando um sistema Shimadzu (LC-20AT) equipado com um detector de matriz (SPD-M20A). A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna TSK-GEL Super-ODS (Supelco®) mantida a 35°C.

Realizou-se um gradiente de eluição variando a proporção do solvente A (ácido fórmico 0,1%, pH 3, em água ultrapura, grau CLAE, v/v) e solvente B (acetonitrila 100%) com fluxo de 0,8 mL/min em gradiente de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Gradiente de fase móvel utilizado na análise do EHSm por CLAE.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0,00	75	25
30,00	50	50
35,00	50	50
40,00	75	25
45,00	75	25

O volume das amostras injetado foi de 10 µL. As substâncias padrão e amostras do extrato (8 mg/mL) foram dissolvidas em acetonitrila e filtradas através de uma membrana de 0.22 µm (Millipore®, EUA). As concentrações das substâncias padrão foram calculadas a partir de curvas padrão calibradas usando 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL.

4.3 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas (*Rattus norvegicus*) com 3 meses de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais receberam água e dieta (Presence®) *ad libitum* e foram mantidos em condições ambientais normais (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pernambuco, processo nº 23076.020687.

4.4. Toxicidade Aguda

O estudo de toxicidade aguda foi realizado em ratos, segundo o protocolo "Up and down", teste 425 descrito pela *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD, 2001), com pequenas modificações.

Ratos Wistar saudáveis, de ambos os sexos, foram submetidos ao jejum de 12 h com livre acesso à água e divididos em quatro grupos ($n=5/\text{grupo/sexo}$). Os grupos em tratamento receberam oralmente o EHSm na dose de 5 g/kg e os grupos controles receberam água (10 mL/kg). Os animais foram observados aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração e diariamente durante 14 dias. Alterações no comportamento, na massa corporal, no consumo de ração e água, sinais clínicos de toxicidade e mortalidade foram registrados diariamente (MALONE, 1977).

4.5 Toxicidade oral de doses repetidas

Este teste seguiu as diretrizes da *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OCDE, 407/2008), com pequenas modificações. Ratos Wistar machos e fêmeas saudáveis foram divididos aleatoriamente em quatro grupos por sexo ($n=8-10/\text{grupo}$). Os animais foram tratados durante 30 dias consecutivos por via oral com EHSm nas doses de 200, 500 e 2000 mg/kg (grupo tratado) ou água potável (grupo controle). Durante o tratamento, a massa corporal, ingestão de alimentos e água dos animais foram registrados semanalmente. Foram observados sinais de toxicidade, como piloereção, diarreia e alterações na atividade locomotora e mortalidade durante o período experimental. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a um jejum de 12 h, com água *ad libitum* e em seguida, anestesiados com xilazina (6 mg/kg) e cetamina (60

mg/kg, i.p.). Após a anestesia, procedeu-se a coleta de sangue por punção da veia cava inferior. O sangue foi coletado em dois tubos: o tubo 1 contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), um anticoagulante para parâmetros hematológicos e o tubo 2 sem anticoagulante, para parâmetros bioquímicos.

4.6 Parâmetros Hematológicos

As análises hematológicas foram determinadas imediatamente após a coleta através do analisador hematológico automático (Coulter STKS, Beckman®). Foram determinados os parâmetros de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição das hemácias (RDW - red cell distribution width) e volume plaquetário médio (VPM). A contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) foi realizada com May-Grünwald-Giemsa, em cada caso, 100 células foram contadas.

4.7 Parâmetros Bioquímicos

Para análise bioquímica, o sangue foi centrifugado a $1480 \times g$ durante 10 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem determinados os seguintes parâmetros: glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina, bilirrubina total, direta e indireta, lactato desidrogenase (LDH) e proteínas totais. As dosagens foram feitas usando sistemas comerciais de diagnóstico padronizados da Boehringer Ingelheim® (COSTA-SILVA et al., 2008).

4.8 Análise morfológica

Após a anestesia, seguiu-se a coleta de sangue pela veia cava inferior (para a remoção do sangue). A necropsia foi realizada nos animais ($n=5/\text{grupo/sexo}$) para analisar as características externas macroscópicas do coração, pulmão, fígado, estômago, baço, rins, adrenais, órgãos reprodutores masculino (testículos, epidídimos e vesícula seminal) e feminino (útero e ovários). Esses órgãos foram cuidadosamente

removidos e pesados individualmente. As massas dos órgãos foram expressas em termos absolutos e relativos (g e g/100g de massa corporal, respectivamente).

O exame histológico foi realizado nos animais restantes do grupo (n=5/grupo/sexo). Os mesmos órgãos foram cuidadosamente removidos e fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram lavadas em água e imersas em álcool a 70% até a realização da análise histológica. Em seguida, os órgãos foram impregnados e incluídos em parafina, de onde foram obtidos cortes com espessura de 5 µm. As lâminas histológicas foram analisadas após coloração com hematoxilina-eosina (HE). A análise histológica dos órgãos foi feita utilizando um sistema de captura de imagens Nikon/Motic®/ImageJ.

4.9 Toxicidade reprodutiva

A observação da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal foi usada para definir o 1º dia de prenhez. Após a identificação da prenhez, as ratas foram aleatoriamente divididas em grupo controle (que recebeu água potável) e grupos tratados por via oral com EHSm nas doses de 200, 500 e 2000 mg/kg. O tratamento foi administrado durante o período de pré-implantação (1º ao 6º dia de prenhez). Durante a prenhez, as ratas foram observadas quanto a sobrevivência, aparência alterada e quaisquer sinais clínicos de toxicidade, tais como mudanças na alimentação e ingestão de água, piloereção, diarreia, mudança de atividade locomotora e sangramento vaginal. O ganho de massa materno também foi determinado diariamente durante a gravidez.

No vigésimo dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas com xilazina (6 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg, i.p.) e eutanasiadas por deslocamento cervical, laparotomizadas e seus cornos uterinos removidos para a avaliação dos seguintes parâmetros: número de implantações, reabsorções, fetos vivos e mortos. Os ovários foram pesados e número de corpos lúteos foi contado. A massa absoluta dos fetos e placentas foram determinadas e examinadas quanto à presença de malformações macroscópicas externas. A taxa de perda de pré-implantação foi calculada como: $\text{número de corpos lúteos} - \text{número de implantações viáveis} / \text{número de corpos lúteos} \times 100$, e a taxa de perda de pós-implantação foi calculada como: $\text{número de implantações} - \text{número de fetos vivos} / \text{número de implantações} \times 100$.

4.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm). As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls. O número de implantações e reabsorções, bem como as taxas de implantação e de perdas pré-implantação e pós-implantação foram analisadas usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn, quando necessário. A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism 6.0 Software. O nível de significância para rejeição da hipótese nula foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A partir da análise do EHSm por CLAE-DAD foi possível identificar quatro padrões analíticos por meio da semelhança entre tempos de retenção e espectro de absorção em ultravioleta, bem como, quantificá-los: quercetina 3- β -D-glicosídeo (isoquercetina) em 5,2 min; resveratrol em 12,8 min ($1,146 \mu\text{g/mL} \pm 0,01$); quercetina em 15,5 min ($15,6 \mu\text{g/mL} \pm 0,02$) e canferol em 21,2 min ($3,01 \mu\text{g/mL} \pm 0,01$) (Figura 3). Quanto a isoquercetina, foi possível determinar sua presença no extrato por semelhança do espectro de absorção no ultravioleta, porém não foi possível quantificá-la com precisão.

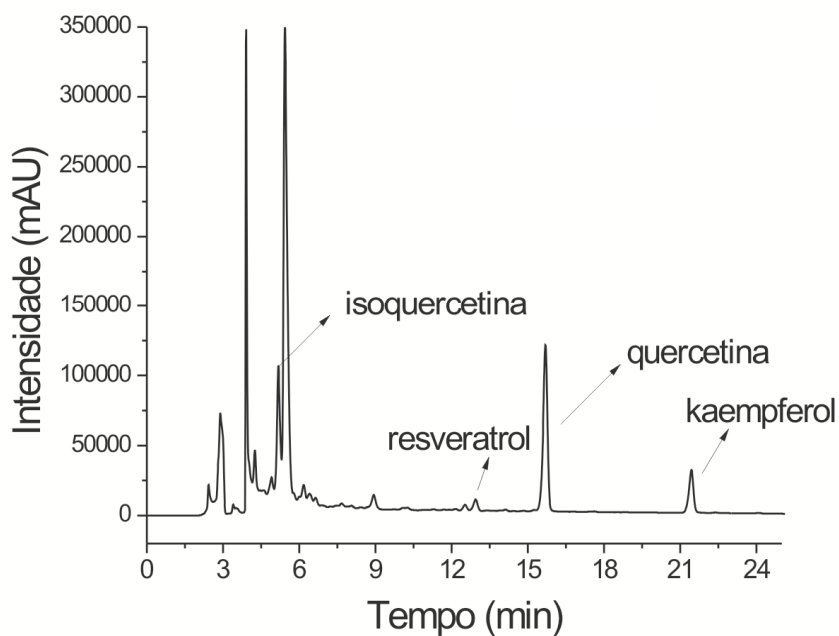


Figura 3. Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) detectado a 340 nm. Picos e Tempo de retenção (Tr): isoquercetina (Tr = 5,2 min), resveratrol (Tr = 12,8 min), quercetina (Tr = 15,5 min) e canferol (Tr = 21,2 min).

5.2 Toxicidade Aguda

O extrato de *Spondias mombin* na dose de 5 g/kg administrado por via oral em ratos Wistar de ambos os sexos, não produziu morte em nenhum grupo no período de 14 dias de observação. Os animais não mostraram sinais clínicos de toxicidade ou alteração comportamental.

5.3 Toxicidade oral de doses repetidas

Nenhum sinal de toxicidade (piloereção, diarreia e alteração na atividade locomotora) ou mortes foram registrados durante os 30 dias consecutivos de tratamento por via oral com o extrato hidroalcoólico de *Spondias mombin* nas doses de 200, 500 e 2000 mg/kg. O ganho de massa corporal em ratos de ambos os sexos não foi afetado durante o tratamento com EHSm quando comparado aos ratos do grupo controle (Figura 4).

O tratamento dos machos não promoveu alterações significativas no consumo de água durante todo o período quando comparado ao grupo controle (Figura 5 A). Houve redução significativa no consumo de ração apenas na primeira semana de tratamento para a dose de 500 mg/kg em relação ao controle (Figura 5 B). O tratamento das fêmeas não comprometeu os consumos de água e ração em relação ao grupo controle durante todo o período (Figura 6).

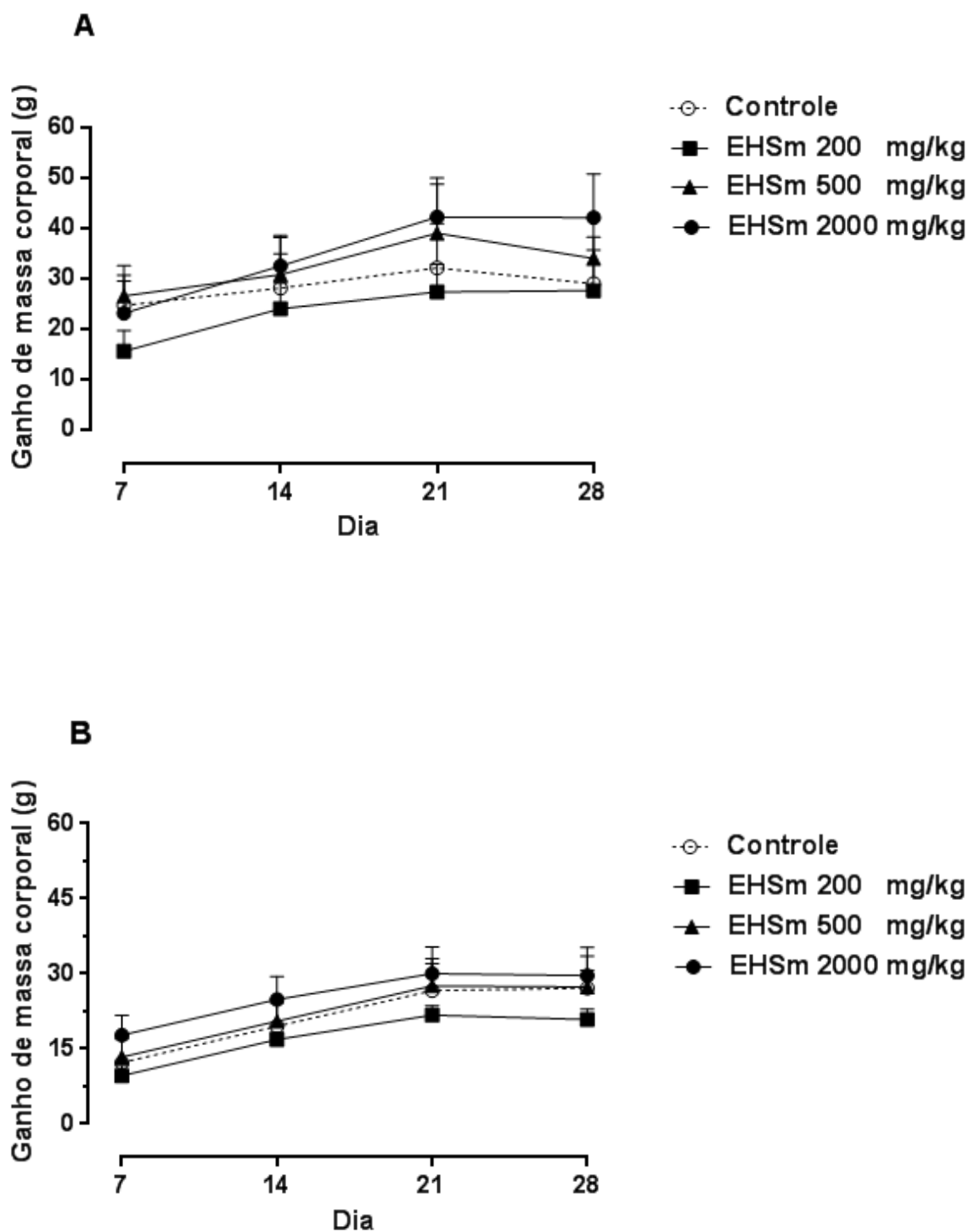


Figura 4. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) por via oral sobre o ganho de massa (g) em ratos Wistar adultos machos (A) e fêmeas (B) tratados por 30 dias consecutivos. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. ($n = 10/\text{grupo}$).

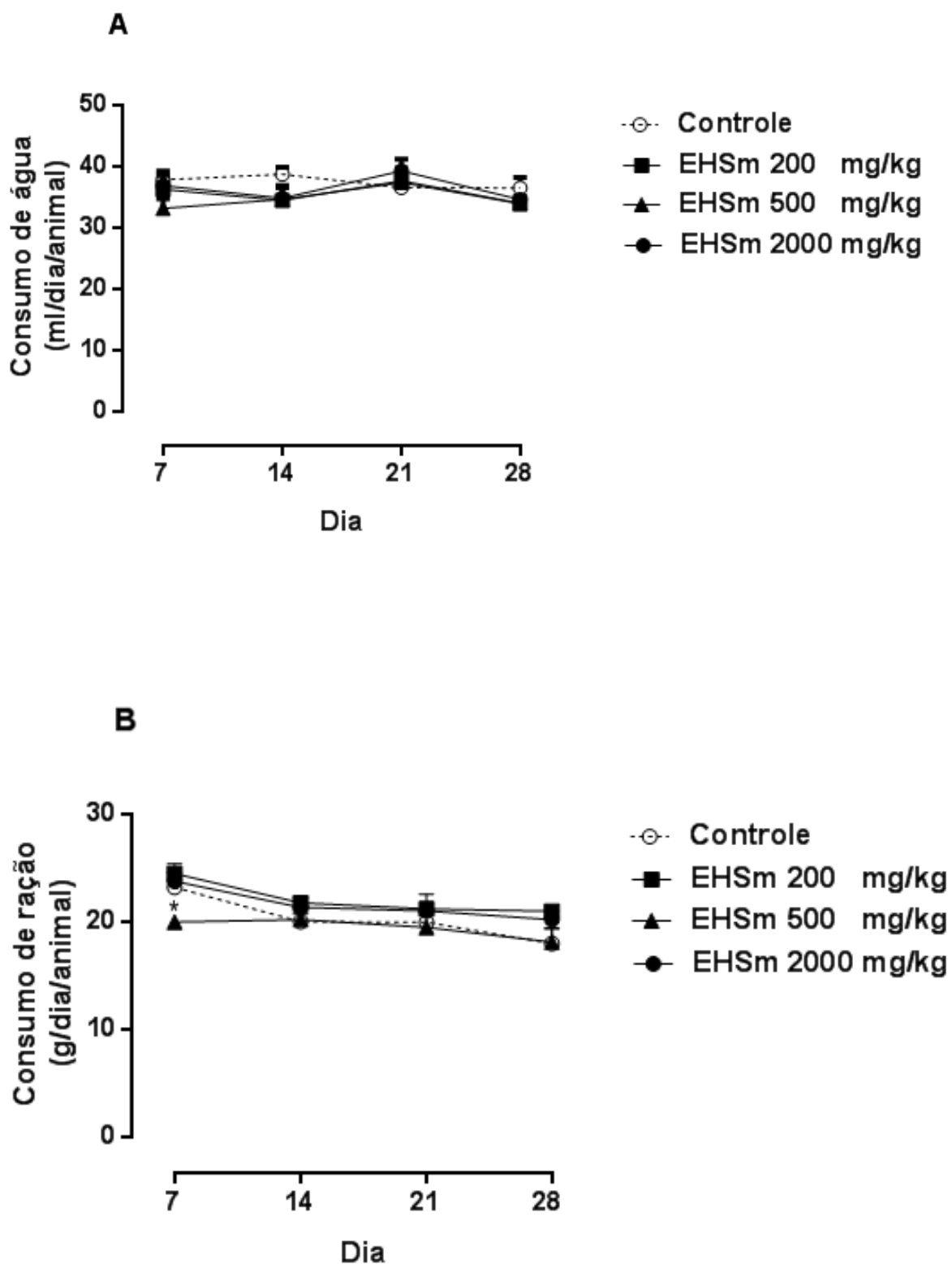


Figura 5. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm) no consumo de água (A) e ração (B) em ratos Wistar machos tratados por via oral durante 30 dias consecutivos. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n= 10/grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

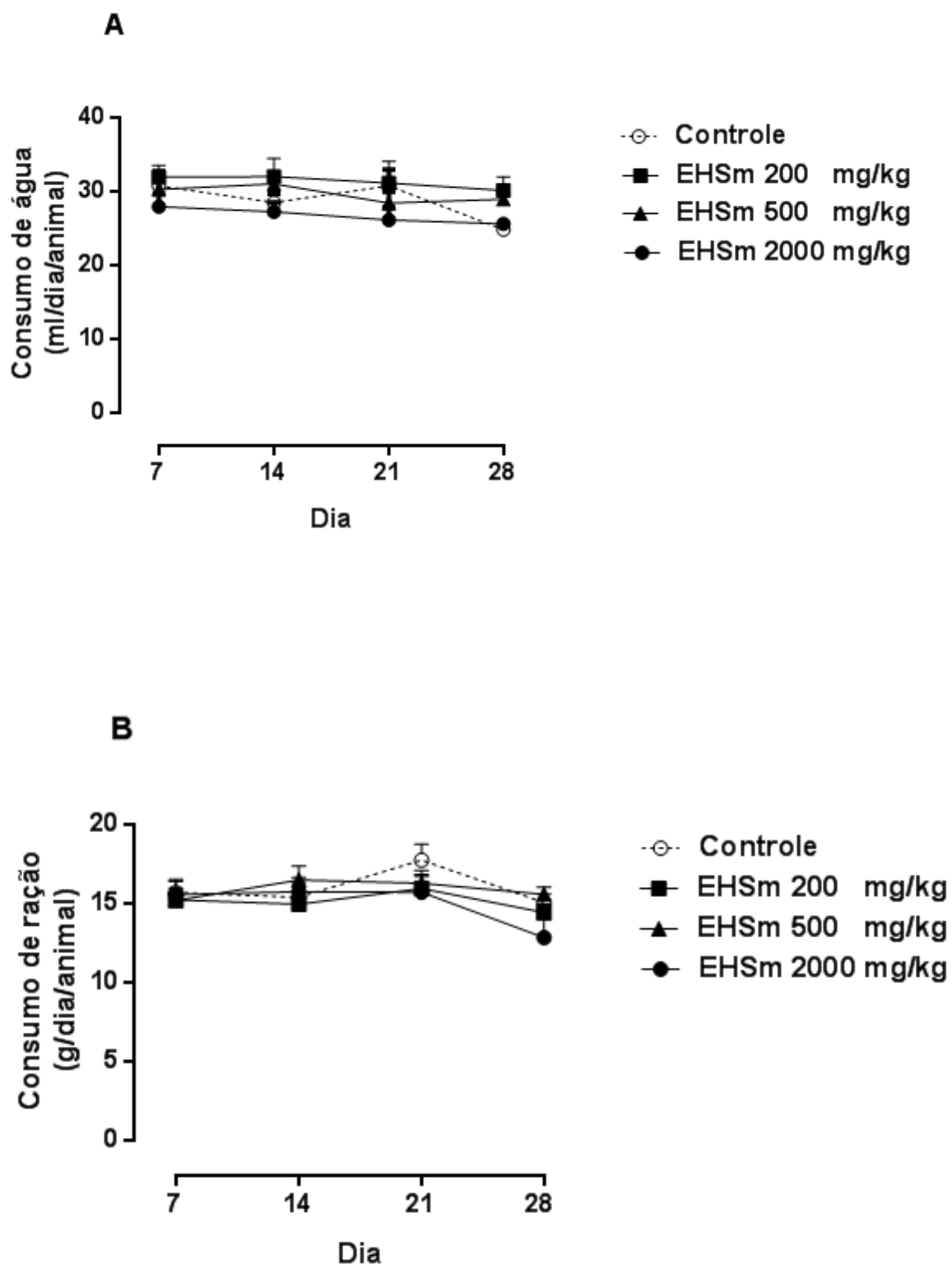


Figura 6. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm) no consumo de água (A) e ração (B) em ratos Wistar tratadas por via oral durante 30 dias consecutivos. Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n= 10/grupo).

5.4 Parâmetros Hematológicos

O perfil hematológico dos grupos controle e tratados são mostrados nas tabelas 2 e 3. Para ratos machos, houve diminuição de 6,1% na contagem de eritrócitos (EHSm 200mg/kg), de 8% e 6,36% nos valores de VCM e HCM, respectivamente (EHSm 2000mg/kg) e um aumento de 20,5%, 414% e 44% nos valores de RDW, basófilos e monócitos, respectivamente (EHSm 2000 mg/kg), quando comparado ao grupo controle. Nos grupos das fêmeas, nenhuma diferença clínica significativa foi registrada em qualquer um dos parâmetros analisados.

5.5 Parâmetros Bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos dos grupos controle e tratados são apresentados nas tabelas 4 e 5. Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis séricos de glicose, uréia, creatinina, AST, colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina, bilirrubina total, direta e indireta, lactato desidrogenase e proteínas totais. No entanto, observou-se uma redução do nível de ALT (38,76%) em ratos machos tratados com EHSm 200 mg/kg e um aumento de 27,5% no índice de glicose no grupo das fêmeas tratadas com EHSm 200 mg/kg, em relação ao grupo controle.

5.6 Análise morfológica

Os pesos absoluto e relativo dos tecidos não foram alterados pela administração do EHSm em ratos Wistar machos (Tabela 6) e fêmeas (Tabela 7). A análise macroscópica externa dos órgãos dos animais tratados com EHSm não mostrou alterações significativas na cor ou textura quando comparado com o grupo de controle.

A análise microscópica dos órgãos mostrou um discreto infiltrado linfocitário no fígado dos ratos de ambos os sexos (EHSm 500 e 2000 mg/kg) (Figura 7) e discreto aumento do espaço capsular renal das fêmeas (EHSm 500 e 2000 mg/kg) e machos em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle (Figura 8).

Os órgãos restantes dos grupos tratados e controle não apresentaram nenhuma constatação de alterações histológicas, todos estiveram dentro dos limites normais.

Tabela 2. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	EHSm 200 mg/kg	EHSm 500 mg/kg	EHSm 2000 mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	8,37 $\pm$ 0,14	7,86 $\pm$ 0,14*	8,22 $\pm$ 0,08	8,77 $\pm$ 0,06
Hemoglobina (g/dL)	16,19 $\pm$ 0,14	15,78 $\pm$ 0,57	16,01 $\pm$ 0,10	15,91 $\pm$ 0,18
Hematócrito (%)	46,62 $\pm$ 0,17	45,12 $\pm$ 1,51	45,76 $\pm$ 0,44	45,16 $\pm$ 0,51
VCM (fL)	56,00 $\pm$ 0,91	57,40 $\pm$ 1,33	55,60 $\pm$ 0,75	51,50 $\pm$ 0,43*
HCM (pg)	19,35 $\pm$ 0,34	20,06 $\pm$ 0,52	19,46 $\pm$ 0,14	18,12 $\pm$ 0,14*
CHCM (g/dL)	34,70 $\pm$ 0,36	34,97 $\pm$ 0,18	34,97 $\pm$ 0,23	35,22 $\pm$ 0,11
RDW (%)	11,75 $\pm$ 0,41	12,70 $\pm$ 0,87	11,86 $\pm$ 0,27	14,16 $\pm$ 0,29*
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	928,25 $\pm$ 43,20	783,40 $\pm$ 48,73	814,00 $\pm$ 45,98	767,17 $\pm$ 29,15
VPM (fL)	6,40 $\pm$ 0,12	6,52 $\pm$ 0,05	6,54 $\pm$ 0,12	6,52 $\pm$ 0,06
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	10,16 $\pm$ 0,61	12,51 $\pm$ 1,19	12,29 $\pm$ 1,03	12,55 $\pm$ 0,83
Neutrófilos (%)	20,55 $\pm$ 2,46	20,15 $\pm$ 3,22	15,84 $\pm$ 2,44	19,74 $\pm$ 3,19
Eosinófilos (%)	0,45 $\pm$ 0,22	0,43 $\pm$ 0,19	0,89 $\pm$ 0,36	0,72 $\pm$ 0,26
Basófilos (%)	0,07 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,10*
Linfócitos (%)	76,11 $\pm$ 2,48	76,57 $\pm$ 3,32	79,86 $\pm$ 2,61	74, 50 $\pm$ 3,26
Monócitos (%)	3,18 $\pm$ 0,41	2,75 $\pm$ 0,33	3,30 $\pm$ 0,19	4,58 $\pm$ 0,52*

Valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (n = 8-10/grupo). VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias e VPM: Volume Plaquetário Médio. * diferença estatística (p<0,05) (ANOVA, seguido por Newman-Keuls).

Tabela 3. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratas Wistar adultas tratadas por 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	EHSm 200 mg/kg	EHSm 500 mg/kg	EHSm 2000 mg/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	8,06 $\pm$ 0,17	8,40 $\pm$ 0,07	8,47 $\pm$ 0,15	8,19 $\pm$ 1,20
Hemoglobina (g/dL)	15,73 $\pm$ 0,27	16,25 $\pm$ 0,18	16,25 $\pm$ 0,12	16,01 $\pm$ 0,24
Hematócrito (%)	44,06 $\pm$ 0,70	44,78 $\pm$ 0,72	45,02 $\pm$ 0,33	44,70 $\pm$ 0,82
VCM (fL)	54,60 $\pm$ 0,81	54,00 $\pm$ 1,05	53,2 $\pm$ 0,86	54,83 $\pm$ 0,70
HCM (pg)	19,54 $\pm$ 0,19	19,57 $\pm$ 0,26	19,20 $\pm$ 0,27	19,59 $\pm$ 0,33
CHCM (g/dL)	35,70 $\pm$ 0,13	36,23 $\pm$ 0,21	36,08 $\pm$ 0,9	35,81 $\pm$ 0,2
RDW (%)	11,00 $\pm$ 0,19	10,80 $\pm$ 0,26	10,72 $\pm$ 0,14	11,49 $\pm$ 0,16
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	956,6 $\pm$ 31,64	897,0 $\pm$ 33,9	993,6 $\pm$ 10,3	888,3 $\pm$ 21,8
VPM (fL)	6,46 $\pm$ 0,13	6,68 $\pm$ 0,15	6,36 $\pm$ 0,02	6,55 $\pm$ 0,08
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	7,83 $\pm$ 0,54	9,38 $\pm$ 0,47	9,22 $\pm$ 0,57	9,84 $\pm$ 0,68
Neutrófilos (%)	17,57 $\pm$ 2,95	18,69 $\pm$ 3,87	17,82 $\pm$ 3,53	15,16 $\pm$ 3,09
Eosinófilos (%)	0,48 $\pm$ 0,16	0,24 $\pm$ 0,10	0,17 $\pm$ 0,10	0,67 $\pm$ 0,27
Basófilos (%)	0,27 $\pm$ 0,09	0,17 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,10	0,22 $\pm$ 0,06
Linfócitos (%)	79,26 $\pm$ 3,22	77,99 $\pm$ 4,17	79,32 $\pm$ 3,74	82,04 $\pm$ 3,49
Monócitos (%)	2,43 $\pm$ 0,46	2,91 $\pm$ 0,47	2,32 $\pm$ 0,38	1,91 $\pm$ 0,28

Valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (n = 8-10/grupo). VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, RDW: Amplitude da Distribuição das Hemácias e VPM: Volume Plaquetário Médio.

Tabela 4. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos tratados por 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	EHSm 200 mg/kg	EHSm 500 mg/kg	EHSm 2000 mg/kg
Glicose (mg/dL)	96,0 ± 10,5	101,7 ± 9,2	104,5 ± 3,9	119,2 ± 7,2
Ureia (mg/dL)	42,57 ± 1,78	36,69 ± 1,44	37,55 ± 1,38	35,59 ± 3,86
Creatinina (mg/dL)	0,52 ± 0,08	0,61 ± 0,11	0,44 ± 0,07	0,59 ± 0,09
AST (U/L)	144,99 ± 9,58	114,66 ± 5,07	111,64 ± 7,99	125,66 ± 10,82
ALT (U/L)	54,18 ± 8,88	33,18 ± 3,01*	42,25 ± 1,60	39,11 ± 3,80
Colesterol total (mg/dL)	74,77 ± 3,12	89,70 ± 11,37	78,98 ± 3,72	89,42 ± 4,59
Triglicerídeos (mg/dL)	48,72 ± 3,51	49,40 ± 6,82	65,11 ± 11,35	60,06 ± 11,33
Fosfatase alcalina (U/L)	119,0 ± 11,9	144,6 ± 45,4	114,6 ± 10,53	104,2 ± 2,78
Bilirubina total (mg/dL)	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Bilirubina direta (mg/dL)	0,05 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,0 ± 0,0
Bilirubina indireta (mg/dL)	0,05 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,10 ± 0,0
LDH (U/L)	609,5 ± 155,2	522,4 ± 75,5	664,5 ± 107,0	641,7 ± 94,4
Proteínas totais	7,1 ± 0,1	7,0 ± 0,1	7,2 ± 0,3	7,0 ± 0,1

Valores representam a média ± erro padrão da média (n = 8-10/grupo). AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina-aminotransferase e LDH: Lactato desidrogenase. *Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p <0,05).

Tabela 5. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm 200; 500 e 2000 mg/kg) administrado por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas tratadas por 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	EHSm 200 mg/kg	EHSm 500 mg/kg	EHSm 2000 mg/kg
Glicose (mg/dL)	85,1 ± 3,5	108,0 ± 5,2*	87,72 ± 6,0	103,6 ± 7,0
Ureia (mg/dL)	42,34 ± 2,49	45,14 ± 3,08	47,10 ± 3,66	38,48 ± 2,19
Creatinina (mg/dL)	0,46 ± 0,03	0,70 ± 0,11	0,69 ± 0,11	0,60 ± 0,11
AST (U/L)	84,50 ± 4,09	117,60 ± 15,33	89,60 ± 8,35	132,67 ± 17,94
ALT (U/L)	34,33 ± 3,27	34,78 ± 4,65	34,00 ± 3,76	33,11 ± 4,93
Colesterol total (mg/dL)	107,9 ± 3,36	98,77 ± 6,40	133,46 ± 18,20	100,06 ± 4,68
Triglicerídeos (mg/dL)	57,61 ± 3,58	54,02 ± 7,24	72,40 ± 11,34	85,97 ± 12,75
Fosfatase alcalina (U/L)	70,80 ± 6,30	65,75 ± 9,78	66,25 ± 1,03	80,16 ± 9,96
Bilirubina total (mg/dL)	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,10 ± 0,00
Bilirubina direta (mg/dL)	0,04 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,05 ± 0,03	0,08 ± 0,02
Bilirubina indireta (mg/dL)	0,06 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,02
LDH (U/L)	494,0 ± 97,3	423,29 ± 71,1	534,56 ± 126,1	428,50 ± 16,72
Proteínas totais	7,3 ± 0,1	7,5 ± 0,3	7,1 ± 0,1	6,7 ± 0,0

Valores representam a média ± erro padrão da média (n = 8-10/grupo). AST: aspartato aminotransferase, ALT: alanina-aminotransferase e LDH: Lactato desidrogenase. *Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p < 0,05).

Tabela 6. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm 200; 500 e 2000 mg/kg), administrados por via oral sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de ratos Wistar tratados por 30 dias consecutivas.

Tecidos	Controle	EHSm 200 mg/kg	EHSm 500 mg/kg	EHSm 2000 mg/kg
Coração (g)	1,29 ± 0,05	1,27 ± 0,05	1,14 ± 0,07	1,13 ± 0,05
Coração (%)	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,43 ± 0,11
Rim (g)	1,24 ± 0,05	1,31 ± 0,06	1,17 ± 0,05	1,27 ± 0,04
Rim (%)	0,33 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,47 ± 0,11
Pulmão (g)	1,62 ± 0,04	1,77 ± 0,10	1,57 ± 0,06	1,48 ± 0,07
Pulmão (%)	0,44 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,47 ± 0,01	0,54 ± 0,11
Fígado (g)	11,13 ± 0,86	10,93 ± 0,95	10,29 ± 0,76	10,67 ± 0,89
Fígado (%)	3,01 ± 0,26	3,01 ± 0,24	3,05 ± 0,16	3,83 ± 0,77
Pâncreas (g)	0,65 ± 0,05	0,54 ± 0,06	0,50 ± 0,05	0,67 ± 0,13
Pâncreas (%)	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,25 ± 0,08
G. adrenal (g)	0,02 ± 0,003	0,03 ± 0,003	0,02 ± 0,003	0,03 ± 0,003
G. adrenal (%)	0,01 ± 0,004	0,01 ± 0,004	0,01 ± 0,004	0,01 ± 0,003
Baço (g)	1,02 ± 0,13	0,91 ± 0,06	0,81 ± 0,08	0,83 ± 0,08
Baço (%)	0,27 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,33 ± 0,11
Estômago (g)	1,79 ± 0,07	1,72 ± 0,07	1,54 ± 0,07	1,57 ± 0,06
Estômago (%)	0,57 ± 0,03	0,48 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,60 ± 0,15
Intestino (g)	0,68 ± 0,05	0,60 ± 0,05	0,67 ± 0,02	0,70 ± 0,07
Intestino (%)	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,27 ± 0,07
Testículo (g)	1,59 ± 0,07	1,59 ± 0,04	1,51 ± 0,05	1,53 ± 0,05
Testículo (%)	0,43 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,58 ± 0,15
V. Seminal (g)	1,38 ± 0,13	1,14 ± 0,11	1,01 ± 0,14	1,06 ± 0,19
V. Seminal (%)	0,37 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,05	0,37 ± 0,07
D. Deferente (g)	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01
D. Deferente (%)	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,003	0,06 ± 0,02
Epidídimo (g)	0,65 ± 0,03	0,72 ± 0,03	0,60 ± 0,04	0,60 ± 0,04
Epidídimo (%)	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,18 ± 0,07
Próstata (g)	0,49 ± 0,05	0,44 ± 0,05	0,41 ± 0,02	0,39 ± 0,04
Próstata (%)	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,03

Valores apresentados como media ± erro padrão da média (n = 5/grupo).

Tabela 7. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg), administrados por via oral sobre as massas absoluta (g) e relativa (%) dos tecidos de ratas Wistar tratadas por 30 dias consecutivos.

Tecidos	Controle	EHSm 200 mg/kg	EHSm 500 mg/kg	EHSm 2000 mg/kg
Coração (g)	0,81 ± 0,02	0,84 ± 0,03	0,88 ± 0,01	0,89 ± 0,02
Coração (%)	0,35 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,36 ± 0,01
Rim (g)	0,80 ± 0,03	0,83 ± 0,04	0,80 ± 0,02	0,89 ± 0,04
Rim (%)	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,36 ± 0,02
Pulmão (g)	1,17 ± 0,06	1,14 ± 0,07	1,13 ± 0,04	1,26 ± 0,08
Pulmão (%)	0,52 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,47 ± 0,02	0,50 ± 0,03
Fígado (g)	7,66 ± 0,75	7,33 ± 0,57	7,10 ± 0,41	9,15 ± 0,88
Fígado (%)	3,41 ± 0,29	3,27 ± 0,20	2,97 ± 0,15	3,61 ± 0,29
Pâncreas (g)	0,57 ± 0,09	0,66 ± 0,10	0,70 ± 0,15	0,59 ± 0,10
Pâncreas (%)	0,26 ± 0,04	0,30 ± 0,05	0,70 ± 0,15	0,24 ± 0,05
G. adrenal (g)	0,03 ± 0,003	0,03 ± 0,003	0,03 ± 0,003	0,03 ± 0,003
G. adrenal (%)	0,01 ± 0,003	0,01 ± 0,004	0,01 ± 0,004	0,01 ± 0,004
Baço (g)	0,60 ± 0,06	0,76 ± 0,09	0,89 ± 0,12	0,63 ± 0,03
Baço (%)	0,27 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,38 ± 0,05	0,25 ± 0,02
Estômago (g)	1,40 ± 0,06	1,31 ± 0,05	1,44 ± 0,07	1,41 ± 0,08
Estômago (%)	0,63 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,60 ± 0,03	0,57 ± 0,04
Intestino (g)	0,83 ± 0,09	0,74 ± 0,07	0,66 ± 0,10	0,66 ± 0,07
Intestino (%)	0,37 ± 0,04	0,33 ± 0,03	0,28 ± 0,04	0,26 ± 0,02
Ovário (g)	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,003	0,05 ± 0,003	0,06 ± 0,003
Ovário (%)	0,02 ± 0,003	0,03 ± 0,003	0,02 ± 0,004	0,02 ± 0,003
Útero (g)	0,49 ± 0,06	0,55 ± 0,05	0,53 ± 0,05	0,51 ± 0,03
Útero (%)	0,22 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,01

Valores apresentados como media ± erro padrão da média (n = 5/grupo).

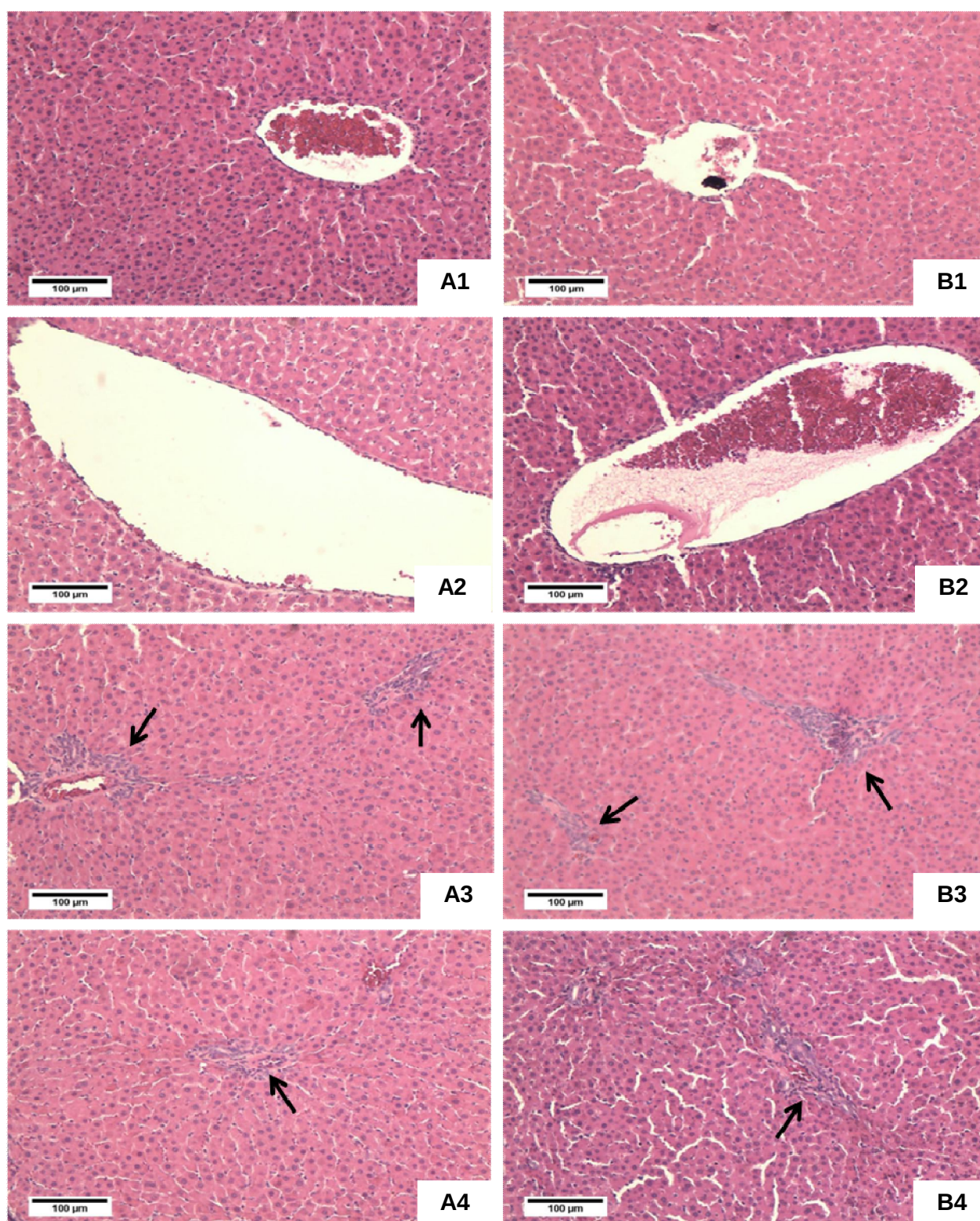


Figura 7. Cortes histológicos do fígado (HE, ampliação 100x) de ratos Wistar machos (A) e fêmeas (B) tratados oralmente por 30 dias consecutivos com água potável (Controle, A1 e B1), EHSm 200 mg/kg (A2, B2), 500 mg/kg (A3, B3) e 2000 mg/kg (A4, B4). As setas indicam discreto infiltrado linfocitário.

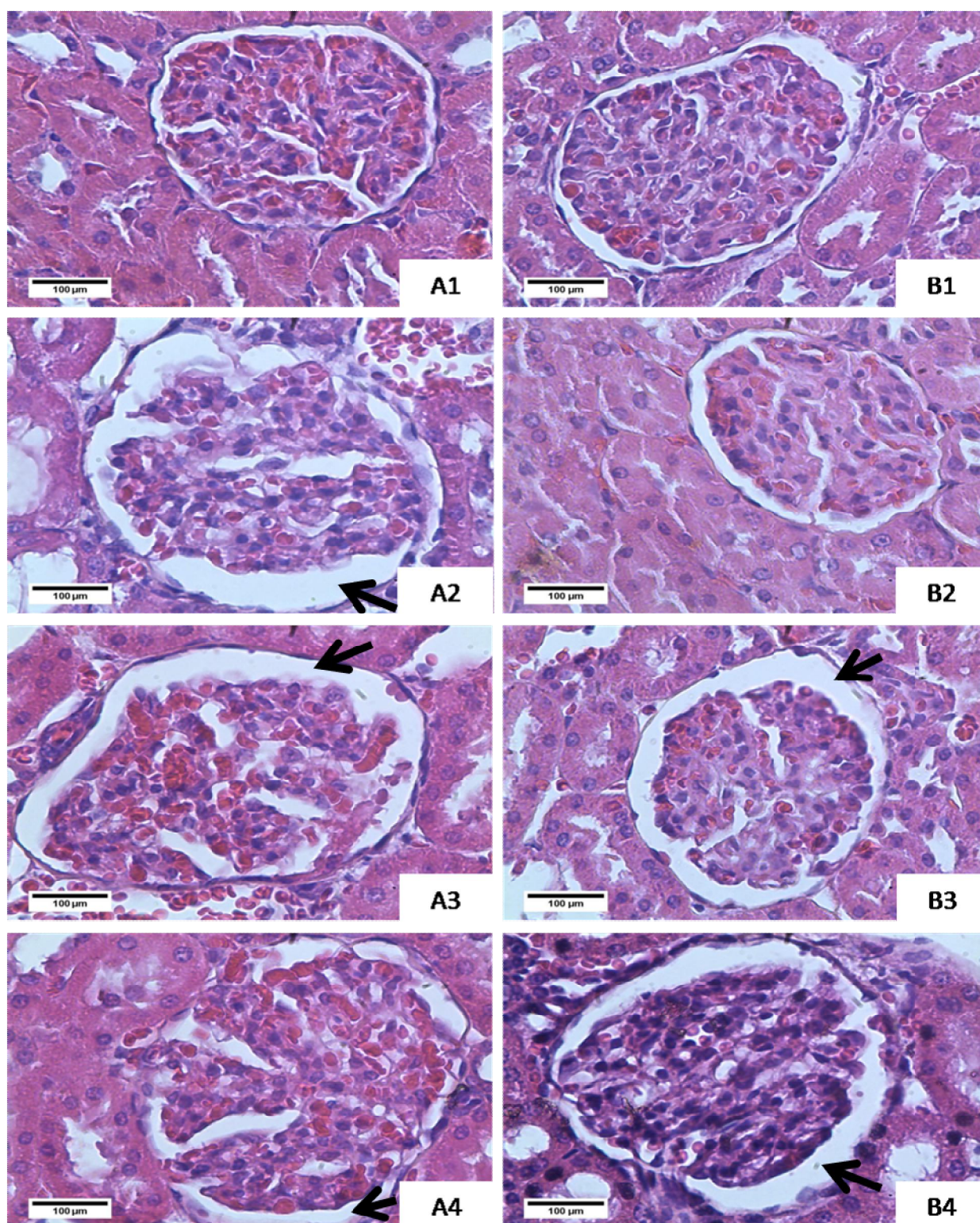


Figura 8. Cortes histológicos do rim (HE, ampliação 100x) de ratos Wistar machos (A) e fêmeas (B) tratados oralmente por 30 dias consecutivos com água potável (Controle, A1 e B1), EHSm 200 mg/kg (A2, B2), 500 mg/kg (A3, B3) e 2000 mg/kg (A4, B4). As setas indicam discreto aumento do espaço da cápsula de Bowman.

5.7 Toxicidade Reprodutiva

O tratamento com EHSm nas doses de 200, 500 e 2000 mg/kg não produziu mortes nas ratas prenhes tratadas durante o período de pré-implantação (1º ao 6º dia). Não foram observados sinais de toxicidade, como salivação, piloereção, diarreia, alterações na atividade locomotora e mudanças no comportamento em todas as doses administradas, no entanto, houve redução do ganho de massa corporal materno no período da pré-implantação em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle (Tabela 8).

Não foi observada nenhuma mudança na ingestão de alimentos em todos os grupos tratados (Figura 9). Porém, foi observado um aumento no consumo de água no grupo tratado com a dose de 2000 mg/kg na segunda e terceira semanas de prenhez (Figura 10).

Em relação aos parâmetros reprodutivos, massas dos fetos, massas dos ovários, massas das placentas e perda de pré e pós-implantação, não foram observadas diferenças entre os grupos tratados durante o período de pré-implantação. Também não foi observada a presença de fetos mortos e o tratamento não provocou o desenvolvimento de malformações macroscópicas externas nos fetos, nem alterações no número de implantações e reabsorções.

Tabela 8. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg), administrado por via oral sobre os indicadores reprodutivos durante o período de pré-implantação (1^o ao 6^o dia) da prenhez em ratas Wistar.

Indicadores reprodutivos	Controle	EHSm 200 mg/kg	EHSm 500 mg/kg	EHSm 2000 mg/kg
Ratas prenhes	6	6	6	6
Ganho de massa na prenhez (g) ¹	55,8 ± 2,6	61,1 ± 6,3	55,7 ± 6,7	61,3 ± 6,2
Ganho de massa (1 ^o -6 ^o) dia de prenhez (g) ¹	19,0 ± 0,9	9,3 ± 1,2*	11,0 ± 1,6*	8,5 ± 1,1*
Nº de fetos vivos/fetos mortos	71/0	66/0	68/0	66/0
Relação feto/mãe ¹	11,8 ± 0,9	11,0 ± 1,3	11,3 ± 0,2	11,0 ± 0,7
Massa absoluta dos fetos (g) ¹	2,25 ± 0,07	2,39 ± 0,13	2,35 ± 0,07	2,20 ± 0,05
Massa relativa dos fetos (g/100g) ¹	0,63 ± 0,06	0,74 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,64 ± 0,03
Massa absoluta das placentas (g) ¹	0,46 ± 0,02	0,53 ± 0,03	0,47 ± 0,01	0,50 ± 0,02
Massa relativa das placentas (g/100g) ¹	0,131 ± 0,014	0,163 ± 0,006	0,136 ± 0,002	0,156 ± 0,010
Massa absoluta dos ovários (mg) ¹	62,33 ± 4,96	61,50 ± 8,56	59,83 ± 3,03	68,17 ± 9,9
Massa relativa dos ovários (mg/100g) ¹	16,33 ± 1,20	18,27 ± 2,16	16,83 ± 0,87	19,83 ± 2,36
Nº total de implantações/	78	72	74	74
Nº de reabsorções	7	6	6	8
Nº de corpos lúteos ¹	13,5 ± 0,9	12,5 ± 1,0	13,0 ± 0,4	13,7 ± 1,4
Taxa de implantação (%) ²	96,3	96	94,9	90,2
Perdas pré-implantação (%) ²	3,7	4	5,1	9,7
Perdas pós-implantação (%) ²	9	8,3	8,1	10,8

Taxa de implantação (nº de implantações/nº de corpos lúteos x 100), perdas pré-implantação (nº de corpos lúteos - nº de implantações/ nº de corpos lúteos x 100) e perdas pós-implantação (nº de implantações - nº de fetos vivos/ nº de implantações x 100). Os valores foram expressos em média ± e.p.m.¹ ou mediana². *Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, p <0,05).

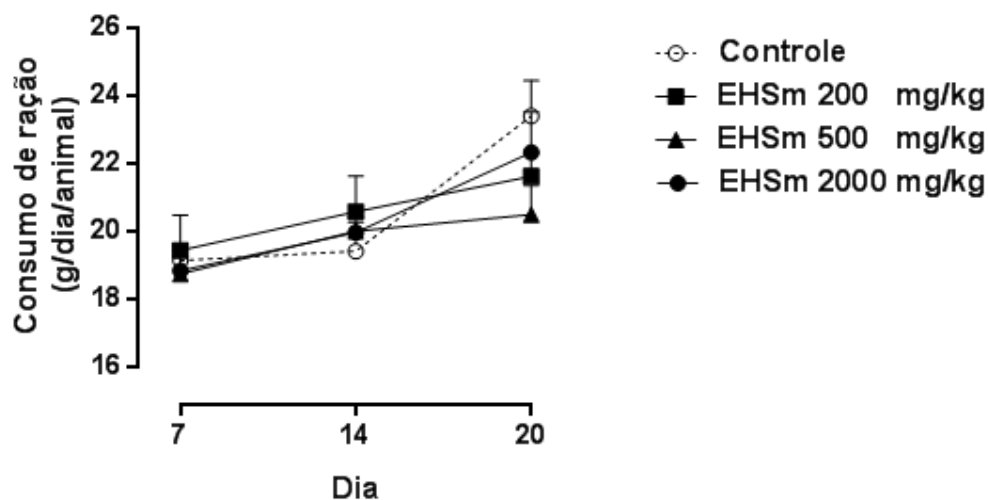


Figura 9. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm) no consumo de ração em ratas Wistar prenhes tratadas por via oral durante o período de pré-implantação (1º ao 6º dia). Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n= 6/grupo).

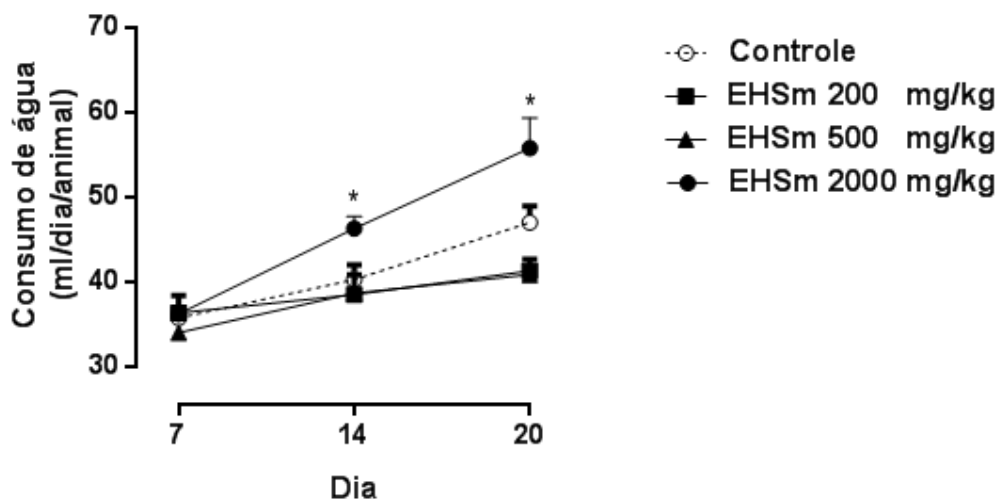


Figura 10. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* L. (EHSm) no consumo de água em ratas Wistar prenhes tratadas por via oral durante o período de pré-implantação (1º ao 6º dia). Os valores representam as médias $\pm$ e.p.m. (n= 6/grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido por Newman-Keuls, $p < 0,05$).

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

A avaliação da segurança de medicamentos e produtos para uso humano é comumente realizada em vários animais experimentais a fim de prever a toxicidade e a fornecer orientações para a seleção de uma dose segura para humanos (RHIOUANI et al., 2008). Uma boa correlação tem sido reportada em estudos toxicológicos entre ratos e humanos. A maior concordância global de testes de toxicidade em animais com os seres humanos é com relação às análises hematológicas, gastrointestinais e cardiovasculares (OLSON et al., 2000).

Spondias mombin é usada popularmente como remédio para várias doenças, suas cascas, ramos e folhas apresentam propriedades medicinais (SACRAMENTO; SOUZA 2000). O extrato das folhas desta espécie apresenta inúmeras atividades farmacológicas, tais como: antiviral e antimicrobiana (CORTHOUT et al., 1991, 1992 e 1994; COATES et al., 1994; ABO et al., 1999; SILVA et al., 2012), leishmanicida (ACCIOLY, 2001), antioxidante (TIBURSKI et al., 2011; SILVA et al., 2012), anticonvulsivante, antipsicótica e ansiolítica (AYOKA et al., 2005 e 2006), anti-helmíntica (ADEMOLA et al., 2005) e anti-inflamatória (NWORU et al., 2011). Entretanto, apesar dos vários estudos farmacológicos existentes, ainda há pouco conhecimento sobre a potencial toxicidade *in vivo* da planta.

No controle de qualidade de uma matéria-prima vegetal e de um medicamento fitoterápico, a RDC 14/2010 preconiza a utilização de um marcador que seria o composto químico ou uma classe de compostos presentes na matéria-prima vegetal, de preferência tendo relação com a atividade farmacológica da mesma. Os marcadores químicos devem ser usados nas inúmeras fases de fabricação de um medicamento à base de plantas, para a autenticação e diferenciação das espécies (SONGLIN et al., 2008).

A análise cromatográfica do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. mombin* permitiu identificar a presença dos flavonoides: quercetina, isoquercetina e canferol, além do polifenol resveratrol. Pela primeira vez no extrato das folhas de *S. mombin* foi identificada a presença do resveratrol, um excelente antioxidante com efeitos benéficos cardiovasculares, eficaz no controle dos níveis de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), reduzindo a pressão sanguínea e os riscos de aterosclerose, além de ter efeitos anti-inflamatório e quimiopreventivo (SZEKERES et al., 2011; GILLESPIE; LENZ, 2012).

Os flavonoides compõem um grupo de metabólitos vegetais fenólicos secundários bem difundidos na natureza e são bem conhecidos por suas atividades biológicas multidirecionais (BRAHMACHARI, 2011).

A presença da quercetina no extrato das folhas de *S. mombin* foi relatada previamente por Silva et al. (2012), sua presença foi identificada por CLAE no extrato hidrometanólico das folhas.

Quanto a isoquercetina (quercetina 3- β -D-glicosídeo), foi possível determinar sua presença no extrato por semelhança do espectro de absorção no ultravioleta, porém não foi possível quantificá-la com precisão. Em estudo realizado com o extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* em análise por Cromatografia por Camada Delgada, seguida por CLAE, também foi identificada a presença da isoquercetina e canferol (CABRAL, 2014). Nesse estudo, devido à indisponibilidade de quantidade suficiente do padrão de isoquercetina, também não foi possível quantificar esse composto.

No que se refere à avaliação toxicológica, o EHSm na dose de 5 g/kg por via oral não produziu morte em ratos de ambos os sexos por um período de observação de até 14 dias, estando em acordo com os estudos realizados com os extratos aquoso, metanólico e etanólico das folhas de *S. mombin* por via oral em ratos, os quais também não demonstraram sinais de toxicidade na dose de 5 g/kg (AYOKA et al., 2005). Dessa forma, o EHSm demonstrou-se seguro no ensaio de toxicidade aguda.

O monitoramento do ganho de peso e consumo de alimentos e água em estudos com animais pode ser um indicador sensível do estado de saúde geral do animal (BORZELLECA, 1996). Alterações de diminuição dos valores nesses parâmetros têm sido usadas como um indicador de efeitos adversos de medicamentos e produtos químicos, sendo um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (JAHN e GÜNZEL, 1997).

A administração de doses repetidas do EHSm (200, 500 e 2000 mg/kg/dia) em ratos de ambos os sexos não causou nenhuma morte ou sinais clínicos de toxicidade (piloereção, diarreia e alteração na atividade locomotora). O consumo de ração não foi alterado nas fêmeas durante os 30 dias de tratamento com todas as doses quando comparadas ao grupo controle, no entanto, nos machos, houve uma diminuição apenas na primeira semana de tratamento com a dose de 500 mg/kg, não sendo observadas alterações nas demais semanas do tratamento. Embora tenha sido observada esta alteração, o ganho de massa corporal de ambos os sexos não foi alterado significativamente em todas as doses utilizadas para o estudo quando comparadas com o grupo controle. Resultados semelhantes de ausência de alteração no ganho de massa corporal foram observados por Raji et al. (2006) em ratos machos tratados com extrato aquoso da casca da *Spondias mombin* por quatro semanas.

A análise dos parâmetros sanguíneos é de grande importância para a avaliação de risco e as mudanças no sistema hematológico têm grande valor preditivo para a toxicidade humana, quando os dados são convertidos de estudos com animais (OLSON et al., 2000). No presente estudo, o tratamento com EHSm não alterou o perfil hematológico. As diferenças estatísticas encontradas no número de eritrócitos (machos tratados com EHSm 200 mg/kg), VCM, HCM, RDW e na contagem diferencial de basófilos e monócitos (machos tratados com EHSm 2000 mg/kg) encontram-se dentro do intervalo de referência descrito para a espécie (HARKNESS et al., 2010) o que sugere que estas variações não apresentam importância clínica.

Semelhante ausência de efeitos tóxicos também foi observada nos parâmetros bioquímicos. Não houve efeito sobre os níveis de glicose, uréia, creatinina, AST, colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina, bilirrubina total, direta e indireta e lactato desidrogenase, exceto por uma redução do nível de ALT em ratos machos tratados com EHSm 200 mg/kg e um ligeiro aumento do nível de glicose no grupo das fêmeas tratadas com a mesma dose do extrato, em relação ao grupo controle. No entanto, todos os valores permaneceram sob a escala de referência para a espécie (HARKNESS et al., 2010).

Os parâmetros sanguíneos analisados por Raji et al. (2006) nos estudos com o extrato aquoso da casca de *Spondias mombin* também não apresentaram anormalidades quando comparados ao grupo controle.

No exame macroscópico, não foram observados quaisquer sinais anormais e/ou alterações na cor, textura ou peso absoluto e relativo dos órgãos internos dos ratos de ambos os sexos tratados com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin*. Embora na análise microscópica tenha sido observada a presença de discreto infiltrado linfocitário no fígado dos ratos de ambos os sexos tratados com EHSm (500 mg/kg e 2000 mg/kg) e aumento do espaço da cápsula de Bowman nos rins das fêmeas (EHSm 500 e 2000 mg/kg) e machos tratados com todas as doses de EHSm, nenhum efeito adverso sobre os marcadores usuais de fígado e toxicidade renal (enzimas hepáticas, ALT, AST, creatinina e ureia) foi observado, indicando que o EHSm não provocou danos significativos nestes órgãos no período estudado.

Ausência de toxicidade histológica dos órgãos alvo (fígado e rins) também foi reportada no estudo de toxicidade sub-aguda em ratos tratados com o extrato aquoso das folhas de *Spondias mombin* nas doses de até 1500 mg/kg. Não foi observada nenhuma diferença patológica nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle (HAMENOO, 2010).

Quanto à toxicidade reprodutiva, a avaliação do EHSm sobre o desenvolvimento embrionário em ratas foi realizada a partir da administração oral durante o período de pré-implantação da gestação. Várias espécies vegetais podem interferir nesse período de prenhez promovendo aumento da perda de pré e pós implantação, retardo no desenvolvimento e morte fetal, além de malformações (ALMEIDA e LEMONICA, 2000; GOONASEKERA et al., 1995; LEITE et al., 2004).

O EHSm, em todas as doses, não produziu sinais como salivação, piloereção, diarreia, redução significativa do consumo de água ou comida, ou alterações na atividade locomotora das ratas prenhez tratadas durante o período de pré-implantação, tais alterações são ferramentas usuais para identificar toxicidade materna (MANSON e KANG, 1994).

Porém, o grupo de 2000 mg/kg apresentou aumento no consumo de água em relação ao grupo controle, na segunda e terceira semanas. O efeito dos extratos na ingestão de água pode ser devido a perturbações na secreção do hormônio antidiurético no hipotálamo ou devido a perturbações no funcionamento normal do rim com o aumento da excreção. A estimulação de sede acontece no núcleo paraventricular do hipotálamo, e pode ser causada em resposta à falta de hormônio antidiurético (ADH) ou estimulação nefrogênica (NOSIRI et al., 2010). Porém, como em nosso estudo de toxicidade de doses repetidas tal alteração no consumo de água não foi observada, bem como não observou-se sinais de toxicidade renal, sugere-se que o aumento do consumo de água das fêmeas prenhes tratadas com o EHSm na dose de 2000 mg/kg esteja relacionado à gestação.

Alteração no ganho de massa corporal no estudo de toxicidade é considerado um parâmetro importante a ser avaliado, mudanças nesses valores podem indicar um efeito tóxico da droga, podendo ser um indicador de efeito colateral adverso (RAZA et al., 2002).

O presente estudo constatou que o tratamento com *S. mombin* por via oral durante o período de pré-implantação da gestação, reduziu significativamente o ganho de massa corporal das ratas. Essa redução foi observada concomitante a administração do EHSm em todas as doses no período da pré-implantação. Após a descontinuação da administração do EHSm, não foram mais observadas diferenças no ganho de massa corporal durante a gestação como um todo (1º a 20º dia). Nossos resultados estão de acordo com o estudo realizado por Uchendu e Isek (2008), com o extrato aquoso etanólico das folhas de *Spondias mombin* administrado intraperitonealmente em ratas prenhes por 4 dias consecutivos a partir do primeiro dia de prenhez. Nesse estudo o ganho de massa corporal foi menor durante o período de tratamento das ratas na fase

inicial da gestação, não sendo observadas tais reduções durante as demais fases de prenhez pós-tratamento.

A redução da massa corporal das ratas prenhes observada no presente estudo indica uma possível toxicidade materna, que deve ser investigada em maior detalhe em estudos subsequentes incluindo os demais períodos da gestação.

Na fase de pré-implantação, o embrião se encontra com células indiferenciadas em divisão mitótica. Sabe-se que a redução do número de células no embrião durante essa fase pode provocar retardo na formação do blastocisto (KOLA; FOLB, 1986), aumento nas perdas de pré e pós-implantação (KVITKO; GIMMLER, 1986). A taxa de perda de pré-implantação é o principal parâmetro avaliado nesse período. Ela estabelece a correlação entre o número de óvulos liberados e aqueles que, após fecundados, conseguiram sofrer implantação no útero (ALMEIDA; LEMONICA, 2000), avaliando, dessa forma, a implantação do blastocisto no útero (CHANG et al., 2002). Enquanto a taxa de reabsorção e perda pós-implantação estabelece correlações entre o número de blastocistos implantados e aqueles que não desenvolveram (ALMEIDA; LEMONICA, 2000).

No que se refere aos parâmetros reprodutivos, não foram observadas diferenças significativas nas massas dos fetos, placentas, número de implantações ou reabsorções e perdas de pré e pós-implantação. Estes parâmetros foram similares nos grupos tratados com o EHSm e o grupo controle, sugerindo uma capacidade normal de reprodução e desenvolvimento dos blastocistos implantados. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados nos valores da massa dos ovários e do número de corpos lúteos, o que pode ser interpretado como um aumento normal do volume do corpo lúteo e como uma produção normal de progesterona (CHANG et al., 2002).

Alterações como redução de massa corporal fetal, morte e malformações, são indicativos de sinais de toxicidade materna (JELÍNEK, 2005). A exposição materna à alguns xenobióticos durante a gestação pode gerar prole com tamanho e peso reduzidos ao nascer, juntamente com maiores taxas de natimortos, morte neonatal, defeitos de nascimento e tumores (CASTRO; PALERMO-NETO, 1988).

As folhas de *S. mombin* têm sido utilizadas popularmente para indução de aborto e expulsão da placenta (UCHENDU; ISEK 2008). Nenhuma morte e/ou malformações dos fetos foram observadas, nem mesmo com a dose mais elevada, sugerindo que o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. mombin*, por via oral, não apresentou efeito abortivo no

período estudado, dessa forma, não encontramos evidências de que o EHSm possa interferir nos processos de pré-implantação.

Estudos realizados com a administração intraperitoneal do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* na dose de 800 mg/kg do 8º ao 11º dia de prenhez (correspondente ao período de organogênese da gestação) também não demonstraram efeito abortivo (UCHENDU; ISEK 2008).

Entretanto, Offiah e Anyanwu (1989), relataram ação abortiva em fetos de ratos e camudongos, nas diferentes fases do desenvolvimento da prenhez com a administração intraperitoneal do extrato aquoso das folhas de *S. mombin* nas doses de 750 e 1500 mg/kg, porém tal efeito também não foi reportado no período inicial da gestação. O estágio fetal da gestação é caracterizado por diferenciação histológica e funcional dos órgãos e sistemas e nesta fase, podem-se gerar alterações funcionais que são capazes de causar a morte do feto (FRITZ e GIESE, 1990).

Diante disso, futuros testes deverão ser conduzidos incluindo o tratamento durante as demais fases da gestação, a fim de melhor caracterizar a toxicidade reprodutiva do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin*.

7. Conclusão

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem constatar os seguintes aspectos:

- A análise química do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* revelou a presença dos padrões analíticos de flavonoides: isoquercetina, quercetina e canferol, corroborando com resultados já descritos na literatura, além da presença do polifenol resveratrol.
- O teste de toxicidade aguda indicou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* é bem tolerado em ratos Wistar na dose de 5 g/kg, não produzindo efeitos tóxicos.
- Os ensaios de toxicidade não clínica mediante tratamento de doses repetidas por via oral, não demonstraram sinais significativos de toxicidade sobre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e morfológicos macroscópicos em ratos Wistar de ambos os sexos. As alterações histológicas ocasionais vistas no fígado e rins não apresentaram relevância clínica, já que ocorreram de forma discreta e não generalizada com os demais testes de toxicidade.
- A administração do extrato hidroalcoólico das folhas de *Spondias mombin* durante o período de pré-implantação da gestação não produziu morte materna ou efeito abortivo e também não alterou os parâmetros comportamentais e o desenvolvimento uterino normal da prole, sugerindo que o EHSm não interfere nos processos de pré-implantação. Contudo, a redução no ganho de massa corporal, no período de tratamento, observada nas ratas tratadas (EHSm 200, 500 e 2000 mg/kg, v.o.) indica uma possível toxicidade materna, que deve ser investigada em maior detalhe em estudos subsequentes incluindo os demais períodos da gestação.

8. Referências

8. REFERÊNCIAS

ABO, K.A.; OGUNLEYE, V.O.; ASHIDI, J.S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 494-497, 1999.

ACCIOLY, M.P. **Atividade leishmanicida in vitro de frações de *Spondias mombin* e *Musa paradisíaca* sobre *Leishmania chagasi***. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2001.

ADEMOLA, I.O.; FAGBEMI, B.O.; IDOWU, S.O. Anthelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep: studies *in vitro* and *in vivo*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, p. 223-235. 2005.

ADLER, T. The return of thalidomide. **Science News**, v. 146, p. 424-425, 1994.

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

AJAO, A.O.; SHONUKAN, O.; FEMI-ONADEKO, B. Antibacterial Effect of Aqueous and Alcohol. Extracts of *Spondias mombin*, and *Alchornea cordifolia* - Two Local Antimicrobial Remedies. **Pharmaceutical Biology**, v.23, n.2, p. 67-72, 1995.

AKINMOLADUN, A.C.; OBUOTOR, E.M.; FAROMBI, E.O. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging capacities of some Nigerian indigenous medicinal plants. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 444-451, 2010.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS, E.M.F.N.; MELO, J. G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 325-354, 2007.

ALMEIDA, C.F.C.B.R. et al. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 674-84, 2010.

ALMEIDA, E.R.; MELO, A.M.; XAVIER, H. Toxicological evaluations of the hidroalcohol extract oh the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. **Phytotherapy Research**, v.14, n.2, p.99-102, 2000.

ALMEIDA, F.C.G.; LEMONICA I.P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of prenancy in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 53-60, 2000.

ALVES, R. E.; FILGUIERAS, H. A.. C.; MOURA, C.F.H. (Org.). **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal: UNESP/SBF, 2000.

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

AYOKA A. O.; AKOMOLAFE R. O.; IWALEWA E. O.; AKANMU M. A.; UKPONMWAN O. E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.103, n. 2, p.166 – 175, 2006.

AYOKA, A.O.; AKOMOLAFE, R.O.; IWALEWA, E.O.; UKPONMWAN, O.E. Studies on the anxiolytic effect of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 2, p. 153-165, 2005.

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

BARROSO, G.M., MORIM, M.P., PEIXOTO, A.L, ICHASO, C.L.F. **Frutos e Sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 433 p.

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

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

BORZELLECA, J.F. A proposed model for safety assessment of macronutrient substitutes. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v. 23, p. 15-18, 1996.

BOSCO, J.; SOARES, K.T.; AGUIAR FILHO, S.P.; BARROS, R.V. **A cultura da cajazeira**. João Pessoa: EMEPA, 2000. 29 p. (Documentos, 28).

BRAHMACHARI, G. Bio-flavonoids with promising antidiabetic potentials: A critical survey. in: Tiwari VK and Mishra BB (Eds) *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*. **Research Signpost: Kerala**, p. 187-212, 2011

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

CABRAL, B. **Caracterização dos marcadores químicos e avaliação de atividades biológicas do extrato de *Spondias mombin* (Anacardiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande Norte, Natal 2014.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n.3, 37-39, 2003.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA Jr., J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**; v. 78, p. 98-106, 2008.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T & C Amazônia**, Ano V, n. 11, 2007.

CASTRO, J.A. Toxicología básica: mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones. **Acta Bioquímica clínica latinoamericana**, v.2, p. 197-206, 1993.

CASTRO, V.L.; PALERMO-NETO J. Alterations in the behavior of young and adult rats exposed to aldrin during lactation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 21, p. 987-990, 1988.

CHANG, C. V., FELÍCIO, A.C., REIS, J. E. P., GUERRA, M. O., PETERS, V. M. Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 265-269, 2002.

CLARK, D.O. Pharmacokinetic studies in developmental toxicology: practical considerations and approaches. **Toxicology Methods**, v. 3, p. 223-251, 1993.

COATES, N.J.; GILPIN, M.L.; GWYNN, M.N.; LEWIS, D.E.; MILNER, P.H.; SPEAR, S.R.; TEYLE, J.W. SB-202742, A novel β - lactamase inhibitor isolates from *Spondias mombin*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 654-657, 1994.

CORDELL, G.A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v.40, n.6, p. 1585-1612, 1995.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; BERGHE, D.V.; VLIETINCK, A.J. Antivirally Active Gallotannins from *Spondias mombin*. **Planta Med**, v. 54, n. 6, p. 573, 1988.

CORTHOUT J.; PIETERS L.; CLAEYS M.; GEERTS, S.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1129-30, 1991.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.A.; CLAEYS, M.; VANDEN-BERGHE, D.A.; VILETINCK, A.J. Antiviral caffeoyl: esters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 79-81, 1992.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; GEERTS, S.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. **Planta Med**, v. 60, n. 5, p. 460-463, 1994.

COSTA-SILVA, J. H.; LIMA, C. R. DE; SILVA, E. J. R.; ARAÚJO, A. V.; RIBEIRO, A. R.; ARRUDA, A. C.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 495-500, 2008.

DIBY, S.B; KONÉ, M; YAPO, A. Potentiel pharmacologique des écorces de tige de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) sur la motricité in vitro du duodénum de lapin ; une plantemédicinale utilisée dans le traitement traditionnel des troubles digestifs. **Phytothérapie**, v. 10, p. 306-312, 2012.

DIMECH, G.S. **Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato bruto de *Mentha crispa***. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pre-Clínica de Compostos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, p. 337-390, 1944.

DREW, A.; MYERS, S.P. Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions. **The Medical Journal of Australia**, v. 166, p. 538-541, 1997.

FABRO, S.; McLACHLAN, J.A.; DAMES, N.M. Chemical exposure of embryos during preimplantation stages of pregnancy: mortality rate and intrauterine development. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.148, p. 929-938, 1984.

FERREIRA, S.H. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FRED-JAIYESIMI, A.; KIO, A.; RICHARD, W. α -amylase inhibitory effect of 3 β -urs-12-en-3-il (9z)-hexadec-9-enoato isolated from *Spondias mombin* leaf. **Food chemistry**, v. 116, p. 285-288, 2009.

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

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

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

GILLESPIE, N.D.; LENZ, T.L. Resveratrol: Potencial Benefits on Aging and Heart Disease. **American Journal of Lifestyle Medicine**, v. 6, n. 5, p. 390-392, 2012.

GOONASEKERA, M.M.; GUNAWARDANA, V.K.; JAYASENA, S.G.; BALUSABRAMANIAN, S. Pregnancy terminating effect of Jathopha curcas in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.47, p.117-123, 1995.

HAMANO, P.S.; MERCADANTE, A.Z. Composition of Carotenoids from commercial products of caja (*Spondias lutea*). **Journal of food composition and analysis**, v. 14, p. 335-343, 2001.

HAMENOO, N.A. **Hepatoprotective and toxicological assessment of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in rodents**. Tese (Departamento de Pharmacology) - Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, College of Health Sciences, Kumasi, 2010.

HARKNESS, J.E., TURNER, P.V., VANDEWOUDE, S., WHELER, C.L. **Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents**, Wiley-BlackWell. 5 ed., 2010.

IGWE, C.U.; ONWULIRI, V.A.; ONYEZE, G.O.C.; OSUAGWU, C.G.; Spasmogenic activity of ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* Linn on isolated uterine muscle strips of rat: possible hormonal mechanism of action. **Research Journal of agriculture and biological sciences**, v. 7, p. 228-233, 2011.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment. **Reproductive Toxicology**, v.11, n.2/3, p.171-178, 1997.

JELÍNEK R. The contribution of new findings and ideas to the old principles of teratology. **Reproductive Toxicology**, v. 20, p. 295-300, 2005.

KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.A.; DOULL, J. **Casarett and Doull's: toxicology the basic science of poisons**, 5ed. New York: McGraw Hill, 1996.

KOLA I.; FOLB P. Chlorpromazine inhibits the mitotic index, cell number, and the formation of blastocyst, and delays implantation of CBA mouse embryos. **Journal Reproduction Fertility**, v.76, p. 527-536, 1986.

KVITKO K.; GIMMLER M.C. Effects of intergerrimine on the implantation and intrauterine development of mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 223-227, 1986.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C.M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. (org) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p.181-196, 2000.

LARINI, L.; OLIVEIRA, G. H. **Avaliação toxicológica**. 2ª edição, São Paulo: Manole, 1993. 54p.

LEITE, S.P.; MEDEIROS, P.L.; SILVA, E.C.; MAIA, M.B.S.; LIMA, V.L.M.; SAUL, D.E. Embryotoxicity in vitro with the extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. **Reproductive Toxicology**, v.18, p.701-705, 2004.

LOACES, D. L.; LUIS, I.R.; CABRERA, G.S. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.6, n.3, 2001.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa. Plantarum, p. 370, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa, p. 544, 2008.

LUCENA, R. F. P. et al. (2012). The ecological apparency hypothesis and the importance of useful plants in rural communities from Northeastern Brazil: Na assessment based on use value. **Journal of Environmental Management**, v. 96, p. 106-15.

MALONE, R.A. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: Warner, H., Wolf, P. (Eds.), **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Berlin: Springer-Verlag, p. 24–53, 1977.

MANSON, J. M.; KANG, Y. J. **Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology**. In: Hayes, A.W. (Ed.). **Principles and Methods of Toxicology**, Raven Press, New York, v. 3, p. 989-1035, 1994.

MENEGOLA, E.; BROCCIA, M.L.; PRATI, M.; GIAVINI, E. Postcoital antifertility activity of aminoalcohols. **Reproductive Toxicology**, v. 12, n. 3, p. 371-374, 1998.

MITCHELL, J.D. & DALY, D.C. **The “tortoise’s cajá’ – A new species of *Spondias* (Anacardiaceae) from southwestern Amazonia**. *Brittonia* v. 50, n. 4, p. 447-451, 1998.

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

NJOKU, P.C.; AKUMEFULA, M.I. Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias mombin* leaves. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 6, p. 13-615, 2007.

NOSIRI, C.I., ANUKA, J.A. & RADINDADI, A.H. 2010. Endosulfan induced polydyspia in adult wistar rats. **The Internet Journal of Pharmacology**, v. 9, n. 1, 2010.

NWORU, C.S.; AKAH, P. A.; OKOYE, F. B.; TOUKAM, D. K.; UDEH, J.; ESIMONE, C. O. The leaf extract of *Spondias mombin* L. displays an anti-inflammatory effect and suppresses inducible formation of tumor necrosis factor- α and nitric oxide (NO). **Journal of Immunotoxicology**, v. 8, p. 10-16, 2011.

OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). **Draft OECD guideline for the testing of chemicals. Guidance no. 407. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents**, Adapted October 3, 2008. Disponible in <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948386.pdf>

OECD (Organisation of Economic for Cooperation and Development). **Guideline for Testing of Chemical: Acute Oral Toxicity - Up-and-Down Procedure**. n. 425, Paris: OECD, 2001.

OECD (Organisation of Economic for Cooperation and Development). **Chronic Toxicity Studies. In: Guideline for Testing of Chemical**. n. 452, Paris: OECD, 2009.

OFFIAH, V.N.; ANYANWU, I.I. Abortifacient activity of an aqueous extract of *Spondias mombin* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, p 317-320, 1989.

OLOYE, A.A.; OYEYEMI, M.O.; OLA-DAVIES, O.E.; OLURODE, S.A.; AJAYI, A.R. Hormonal variation in gravid does after oral treatment with crude ethanol extract of *Spondias mombin*. **Journal of Natural Products**, v. 6, p. 56-60, 2013.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; VAN DEUN, K.; SMITH, P.; BRUCE BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 56-67, 2000.

PELL, S.K., MITCHELL, J.D., MILLER, A.J. & LOBOVA, T.A. 2011. Anacardiaceae, *In* K. Kubitzki (ed.) **The families and genera of vascular plants. X. Flowering plants. Eudicots. Sapindales, Curcubitales, Myrtales**. Springer, Berlin, p. 7-50.

RAJI, Y., GBADEGESIN, M.A., OSONUGA, O.A.; ADISA, R.A., AKINSOMISOYE, O.S., AWOBAJO, F.O., KUNLE-ALABI, O.T., ESEGBUE, P.P.R.C., OSONUGA, I.O., LAMIDI, A.F. Reproductive, Haematologic and Biochemical profiles of male rats treated with aqueous extract of *Spondias mombin* bark. **International Journal of Pharmacology**, v.2, p.126-130, 2006.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, O.A.; EL-HADIYA, T.M.; AL-MAJED, A.A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v.70, p.135-145, 2002.

RHIOUANI H, EL-HILALY J, ZAFAR HI and BADIAA L. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 378-386, 2008.

SACRAMENTO, C.K.; SOUZA, F.X. **Cajá (*Spondias mombin* L.)**. Jaboticabal: Funep. (Série Frutas Nativas, 4), p.42, 2000.

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

SILVA, A.R.A.; MORAIS, S.M.; MARQUES, M.M.M.; LIMA, D.M.; SANTOS, S.C.C.; ALMEIDA, R.R.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F. Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including. Tropical Diseases**, v. 17, p. 406-413, 2011.

SILVA, A.R.A.; MORAIS, S.M.M.; MARQUES, M.M.M.; OLIVEIRA, D.F.; BARROS, C.C.; ALMEIDA, R.R.; VIERIRA, I.G.P.; GUEDES, M. I. F. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Notheastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v.50, n.6, p. 740-746, 2012.

SILVA, E. J. R. **Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Compostos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

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

SILVA-LUZ, C.L. & PIRANI, J.R. **Anacardiaceae**. In R.C. Forzza et. al. (org.) Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.1, p. 599-602, 2010.

SONGLIN, L.I.; QUANBIN, H.A.N.; CHUNFENG, Q.I.A.O.; JINGZHENG, S.O.N.G.; CHUEN LUNG, C.H.E.N.G.; HONGXI, X.U. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: na Overview. **BioMed Central**, v.3, p. 1-16, 2008.

SZEKERES, T; SAIKO, P.; FRITZER-SZEKERES, M.; DJAVAN, B.; JAGER, W. Chemopreventive effects of resveratrol and resveratrol derivatives. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p.89-95, 2011.

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

THOMAS, B.C. A reconsideration of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 61, n. 2, p. 483-490, 1974.

TIBURSKI, J.H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY, R.L. de O.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44, p. 2326-2331, 2011.

TROPICOS. Global Plants. **Entry for *Spondias mombin* Linn. [family Anacardiaceae]**, 2013. Disponível em: <http://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.upwta.1_210>.

UCHENDU, N.C.; ISEK, T. Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) in rats. **African Health Sciences**. v.8, p. 163-167, 2008.

VILLEGAS, L.F.; FERNANDEZ, I.D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALA, A.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n.3, p. 193-200, 1997.

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

WILSON, J.G.; BRENT, R.L.; JORDAN, H.C. Differentiation as a determinant of the reaction of rat embryos to x-irradiation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.82, p.67-70, 1953.

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