

TOXICIDADE



Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozóides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo

Evaluation of short-term exposure to Caesalpinia ferrea on male Wistar rats' vital organs, reproductive system and sperm production

Maycon de Moura Reboredo*

Leda Marília Fonseca Lucinda*

Camila Barros Rocha*

Graziela Tonioni de Queiroz*

Vinícius Caetano de Faria*

Vinícius de Almeida Vieira*

Rita de Cássia da Silveira e Sá**

José Carlos Tavares de Carvalho*

REBOREDO, M. M.; LUCINDA, L. M.F.; ROCHA, C. B; QUEIROZ, G. T.; FARIA, V. C.; VIEIRA, V. A. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozóides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 25, p. 17-29, 2006.

Resumo: Este estudo avaliou o efeito da administração de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozóides de ratos Wistar, submetidos a tratamento subagudo. Foram utilizados ratos Wistar adultos (90 dias), divididos em grupos controle (n=15) e tratado (n=15). Cada animal do grupo tratado recebeu, via intragástrica e uma vez ao dia, 1 mL do extrato aquoso de *C. ferrea*, na dose de 300 mg/kg de peso corporal durante cinco dias. Os animais do grupo controle receberam 1 mL de água destilada. Os animais foram sacrificados no 19^o dia. Procedeu-se análise da concentração de espermatozóides obtida da secreção da cauda do epidídimo direito. Após laparotomia, foram removidos e pesados os seguintes órgãos: testículos, epidídimo esquerdo, próstata, vesícula seminal, rins, fígado, pulmão, cérebro e hipófise. Os resultados indicam que houve perda significativa de peso da vesícula seminal dos animais tratados e nenhuma perda significativa de peso corporal e demais órgãos. Também não houve diferença significativa na concentração de espermatozóides entre os grupos. Em uma análise preliminar, a administração de *C. ferrea* a ratos submetidos a tratamento de curta duração reduziu o peso da vesícula seminal, sendo esses dados sugestivos de um possível efeito tóxico dessa planta no sistema reprodutor.

* Centro de Biologia da Reprodução/UFJF.

** Professora do Departamento de Biologia (UFJF) e Pesquisadora do Centro de Biologia da Reprodução/UFJF.

Palavras-chave: *Caesalpinia ferrea*. Ratos Wistar. Sistema reprodutor.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo, há muito tempo, utilizadas pela população mundial como matéria-prima para o tratamento informal, cura e prevenção de seus males. A popularidade alcançada pelo tratamento de doenças mediante o uso de plantas, entretanto, aumentou a preocupação dos pesquisadores em relação à eficácia dos tratamentos fitoterápicos e aos reais efeitos que os mesmos possam exercer no organismo. As plantas servem como fonte natural de substâncias, mas, seu uso, sob o ponto de vista terapêutico, não deve ser indiscriminado. Como preconiza a toxicologia, toda substância, mesmo sendo de origem natural, pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração (BARROS; DAVINO, 1996). Além disso, as plantas podem apresentar na sua constituição substâncias capazes de causarem efeitos adversos no organismo, que podem interferir com o funcionamento de órgãos vitais e não-vitais.

A *Caesalpinia ferrea* Mart., popularmente conhecida no Brasil como Juca ou Pau-ferro, é uma planta da família Leguminosae, cujas ações antifúngica (LIMA et al., 1994) e anti-ulcerogênica (BACCHI; SERTIE, 1994; BACCHI et al., 1995) foram demonstrados em estudos prévios. O extrato aquoso bruto do fruto dessa planta apresenta propriedades analgésica e antiinflamatória (CARVALHO et al., 1996), sendo o fruto também utilizado no tratamento de diabetes (BALBACH, 1972), tosse e lesões; e as infusões aquosas, na prevenção do câncer (HASHIMOTO, 1996; NAKAMURA et al., 2002 a, b).

Estudos fitoquímicos mostraram a presença de vários compostos em *C. ferrea*. O extrato benzênico dessa planta forneceu sitosterol, ácidos palmítico e octacosanóico, e o extrato alcoólico forneceu galato de etila, ácidos gálico e elágico (SANTOS; SANT'ANA, 1985 apud STASI; HIRUMA-LIMA, 2002, NAKAMURA et al., 2002 a, b). De acordo com a literatura consultada, poucas informações foram encontradas a respeito da toxicidade de *C. ferrea* em órgãos vitais e não vitais, tendo sido relatado a ocorrência de efeito hepatotóxico dessa espécie (QUEIROZ NETO et al., 1991 apud STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

O efeito da administração da *C. ferrea* no sistema reprodutor masculino ainda é desconhecido. Contudo, este sistema é muito sensível à ação de fatores nocivos, pois sua exposição a determinados agentes pode gerar alterações que comprometem a competência reprodutiva do indivíduo. A ação de um agente tóxico pode interferir na maturação sexual, na produção e no transporte de gametas, no ciclo espermatogênico, no comportamento sexual e na fertilidade (KIMMEL; GLEGG; CRISP, 1995). Neste contexto, a toxicidade do sistema reprodutor geralmente é determinada a partir da avaliação dos efeitos produzidos no eixo hipotálamo-hipófise, no funcionamento das gônadas, no epidídimo e nas glândulas sexuais acessórias (FERREIRA; MEDEIROS, 2000).

Considerando o seu uso popular e a ausência de estudos na área da reprodução, este estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade do extrato aquoso de *C. ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. Os protocolos experimentais de curta duração constituem um instrumento relevante na experimentação animal que permitem a identificação de órgãos alvo, células afetadas e mecanismos de toxicidade de determinada substância (ZENICK et al., 1994).

MATERIAL E MÉTODOS

Caesalpinia ferrea foi coletada na região de Belém (Pará – Brasil) e identificada pelo Dr. Antonio Barioni Guzman. Uma exsicata dessa espécie (nº 3221) é mantida no Herbário (SPFR) do Departamento de Biologia da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. O extrato aquoso foi preparado com frutos secos de *C. ferrea* pelo Dr. José Carlos T. Carvalho da Universidade de Alfenas (UNIFENAS – MG). O material foi reduzido a pó e macerado com água para obtenção de um extrato aquoso bruto. O teor de resíduo seco, a partir desse extrato, foi calculado por perda por dessecação em estufa ou em balança acoplada a secagem por infravermelho, tendo sido obtido, em ambos os casos, o valor de 23%. Cada 100 mL do extrato bruto foi diluído para 300 mL com água, perfazendo uma solução aquosa com concentração final de 76,6 mg/mL.

Foram utilizados 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) com 90 dias de idade, pesando entre 230 e 330 g, provenientes da colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF.

Os ratos foram alojados em gaiolas de polipropileno, cobertas com camas de maravalha (não esterilizada) e dotadas de cocho para ração do tipo peletizada e local para mamadeira com água filtrada. Cada rato foi mantido individualmente em uma gaiola e recebeu 25 g de ração por dia e água filtrada *ad libitum*.

O alojamento onde os animais foram mantidos possui amplos basculantes telados, dois exaustores e aquecedores de ambiente. A temperatura foi controlada e mantida em torno de 22° C, pela ventilação natural no verão e, no inverno, com ajuda de aquecedores. Os animais foram submetidos ao ciclo claro/escuro de 12 horas, com iluminação mista, luz natural e lâmpadas incandescentes, programadas para acenderem às 6:00 horas e apagarem às 18:00 horas. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFJF (protocolo 003/2004).

Para a avaliação da toxicidade de *C. ferrea* sobre o sistema reprodutor de ratos Wistar foi aplicado o teste de toxicidade subaguda, com tratamento durante cinco dias e necropsia 14 dias após o término do tratamento.

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos de 15 animais cada, compreendendo os grupos controle e tratado. Cada animal do grupo tratado recebeu, via intragástrica e uma vez ao dia, 1 mL do extrato aquoso de *C. ferrea*, que equivale a dose de 300 mg/kg de peso corporal, durante cinco dias (CARVALHO et al., 1996). Os animais do grupo controle receberam 1 mL de água destilada, seguindo o mesmo procedimento.

Os animais foram pesados no primeiro dia de tratamento, a cada dois dias e no dia de sacrifício. Durante todo o tratamento, os animais foram observados diariamente para a detecção de ocorrência de sinais clínicos de toxicidade, como a presença de piloereção, a alteração da atividade locomotora e mortes (KHERA, 1984; MASON; KANG, 1994). O consumo diário de ração foi medido pela diferença entre a quantidade pré-estabelecida (25 g/dia) de ração colocada no coxo num dia e o que restou dela no dia seguinte. Os animais foram sacrificados por inalação excessiva de anestésico no 19º dia. Foi realizada a laparotomia para remoção e pesagem dos seguintes órgãos: testículo direito, testículo esquerdo, epidídimo

esquerdo, vesícula seminal, próstata ventral, rim direito, rim esquerdo, fígado, pulmão, cérebro e hipófise.

Os espermatozoides foram coletados na secreção epididimária da cauda do epidídimo direito para se proceder a contagem dos espermatozoides, em câmara de Neubauer (MORAES, 1994). O número total de espermatozoides foi obtido pela média de duas contagens, correspondentes ao campo superior e inferior da câmara de Neubauer. Foram identificados e contados os espermatozoides portadores de algum tipo de anormalidade.

Procedeu-se à análise estatística dos dados, sendo os valores expressos em média e desvio padrão. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância $\alpha=0,05$ (SOKAL; ROHLF, 1995).

RESULTADOS

Durante o tratamento não ocorreram mortes e não foi detectada a ocorrência de piloereção, alteração da atividade locomotora e nenhum outro sinal clínico de toxicidade. Não foi observada diferença significativa do peso corporal (Gráfico 1) entre os animais do grupo controle e tratado. O consumo de ração também não se alterou devido ao tratamento. (Gráfico 2).

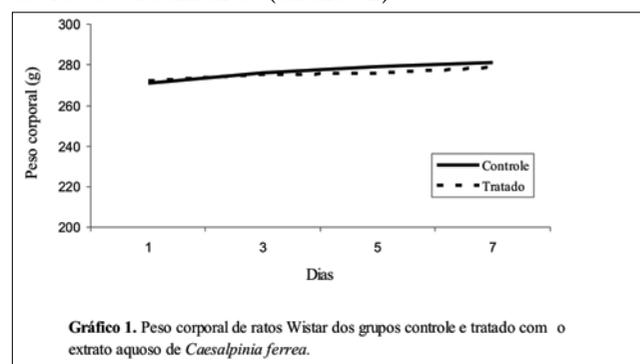


Gráfico 1. Peso corporal de ratos Wistar dos grupos controle e tratado com o extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea*.

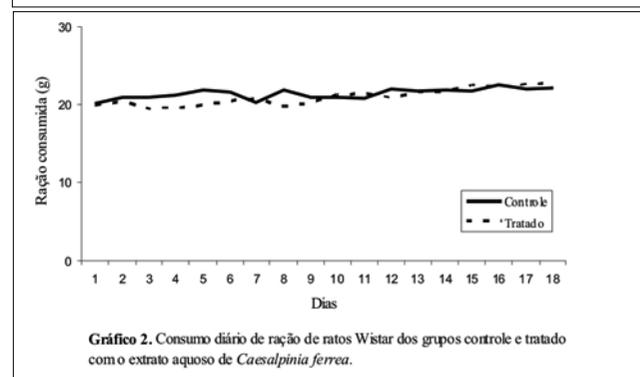


Gráfico 2. Consumo diário de ração de ratos Wistar dos grupos controle e tratado com o extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea*.

Houve perda significativa de peso da vesícula seminal dos animais tratados e nenhuma alteração significativa de peso de cérebro, hipófise, pulmão, fígado, rim direito, rim esquerdo, testículo direito, testículo esquerdo, epidídimo esquerdo e próstata (Tabela 1).

Tabela 1: Peso dos órgãos vitais, do sistema reprodutor e das glândulas acessórias de ratos Wistar dos grupos controle e tratado com extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea*.

| Órgão | Peso (g) | |
|--------------------|------------------|----------------|
| | Controle (n =15) | Tratado (n=15) |
| Cérebro | 1,28 ± 0,04 | 1,27 ± 0,05 |
| Hipófise (mg) | 9,53 ± 1,85 | 10,2 ± 1,61 |
| Pulmão | 1,37 ± 0,08 | 1,37 ± 0,20 |
| Fígado | 12,34 ± 2,01 | 12,96 ± 1,35 |
| Rim direito | 1,17 ± 0,08 | 1,13 ± 0,11 |
| Rim esquerdo | 1,17 ± 0,07 | 1,14 ± 0,12 |
| Testículo direito | 1,31 ± 0,14 | 1,26 ± 0,11 |
| Testículo esquerdo | 1,31 ± 0,13 | 1,26 ± 0,08 |
| Epidídimo esquerdo | 0,46 ± 0,04 | 0,42 ± 0,06 |
| Vesícula seminal | 0,29 ± 0,04 | 0,26 ± 0,04* |
| Próstata | 0,34 ± 0,08 | 0,34 ± 0,04 |

Valores expressos em média ± desvio-padrão. N = 15. * p<0,05

Não houve diferença significativa na concentração de espermatozoides dos animais do grupo tratado em relação aos animais do grupo controle (**Controle** = $1193 \pm 265,3 \times 10^6$ e **Tratado** = $1304 \pm 358,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL). O Gráfico 3 mostra a proporção de espermatozoides normais e anormais dos grupos controle e tratado. As anormalidades mais comuns foram espermatozoides sem cauda, cauda enrolada, sem cabeça e cauda curta, e suas concentrações foram similares em ambos os grupos.

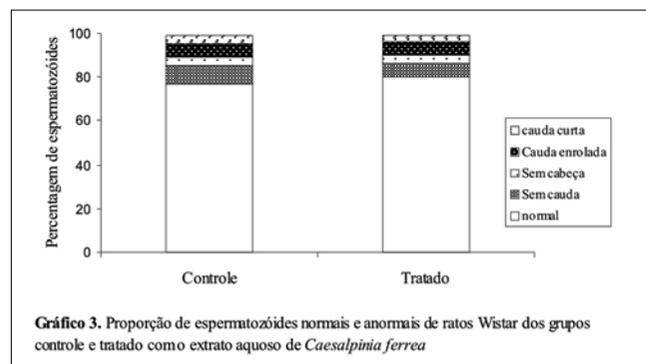


Gráfico 3. Proporção de espermatozoides normais e anormais de ratos Wistar dos grupos controle e tratado como extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea*

DISCUSSÃO

Caesalpinia ferrea é uma planta conhecida na medicina popular, especialmente nas regiões norte e nordeste do Brasil, por suas diversas propriedades terapêuticas. Apesar do seu uso difundido sob a forma de infusos ou decoctos, extratos fluidos e xaropes, poucos estudos foram realizados para avaliar o potencial tóxico dessa planta no organismo.

O efeito tóxico de extratos de plantas é avaliado a partir de alterações do peso corporal e de órgãos vitais e não vitais dos animais, como, por exemplo, os órgãos reprodutores. No sistema reprodutor masculino, a perda de peso das gônadas, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, e também a diminuição da produção de espermatozoides são considerados critérios padrões para a caracterização de agentes tóxicos, que provavelmente causam efeitos adversos nos indivíduos tratados (DIDOLKAR et al., 1988; RAJASEKARAN et al., 1988; DIXIT; GUPTA; GUPTA, 1989; MANONAYAGI et al., 1989; CHANG; GU; SAKSENA, 1990; HIREMATH et al., 1997; QUEIROZ NETO, 1997).

No presente trabalho, ratos Wistar adultos foram submetidos a um tratamento de curta duração, seguindo o protocolo experimental proposto por Linder e outros (1992), que compreende a administração do extrato por cinco dias consecutivos e a necropsia dos animais 14 dias após o término do tratamento. Os protocolos de toxicidade subaguda são instrumentos de experimentação que permitem a identificação de órgãos e células afetadas pela administração de determinado agente bem como os mecanismos de toxicidade envolvidos. Neste experimento, os animais foram tratados com o extrato aquoso de *C. ferrea* por cinco dias na dose de 300 mg/kg de peso corporal, correspondendo à dose utilizada em estudos prévios para a avaliação das propriedades analgésica e antiinflamatória desta planta (CARVALHO et al., 1996).

A redução de peso corporal de animais submetidos a tratamento é um indicativo de ação tóxica de uma substância no organismo (HIREMATH et al., 1997). Tal situação não foi evidenciada neste estudo, pois não houve redução de peso corporal e nem alteração do consumo de ração dos animais tratados, que apresentaram ganho de peso semelhante aos animais do grupo controle.

Em relação aos órgãos vitais analisados, não foi observado ganho ou perda significativa de peso, incluindo

o fígado, cujo efeito hepatotóxico foi relatado em estudo prévio (QUEIROZ NETO et al., 1991 apud STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). A hipófise, glândula responsável pela produção de hormônios (hormônio folículo estimulante – FSH – e hormônio luteinizante – LH) que atuam diretamente nos testículos, também não teve seu peso alterado. Qualquer alteração no funcionamento dessa glândula poderá interferir com o desenvolvimento e o funcionamento normal do sistema reprodutor masculino, afetando a produção dos hormônios sexuais e a produção de gametas (MAHONY; HODGEN, 1995). A vesícula seminal e a próstata são glândulas andrógeno-dependentes e a perda de peso pode ser considerada uma indicação indireta de atrofia desses órgãos, embora outros fatores não hormonais sejam capazes de alterar a fisiologia dessas glândulas e causar redução de seu peso. Os resultados obtidos mostraram perda significativa de peso de vesícula seminal dos ratos do grupo tratado com o extrato aquoso de *C. ferrea*, o que poderia ser considerado sugestivo de efeito tóxico no sistema reprodutor. Entretanto, como não ocorreram alterações no peso de hipófise, testículos, epidídimo e próstata, a alteração de peso da vesícula seminal poderia não ter significado biológico, mas há necessidade de avaliação da concentração de testosterona plasmática e de exames anatomopatológicos para uma conclusão definitiva.

Outro aspecto de grande importância para a verificação da ação de substâncias no sistema reprodutor inclui a ocorrência de efeitos na espermatogênese e na qualidade do gameta produzido (BLAZAK; ERNST; STEWART, 1985; ZENICK et al., 1994). Neste caso, os tratamentos de curta duração podem ser utilizados para demonstrar a ocorrência de alterações do número e da morfologia de espermatozoides, após a exposição a uma substância tóxica, considerando que durante esse período os espermatozoides sofrem o processo de maturação no epidídimo (LINDER et al., 1990, 1992, 1994; MASON; KANG, 1994). Neste trabalho, a produção de gametas e a sua morfologia não foram afetadas pelo tratamento, considerando que as proporções de gametas normais e anormais foram comparativamente semelhantes entre os animais dos grupos: controle e tratado, o que corrobora os dados anteriores que indicam a ausência de efeito tóxico no sistema reprodutor do rato Wistar.

CONCLUSÃO

No modelo experimental usado, o extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* não causou alterações no peso dos órgãos vitais de ratos, exceto pela redução de peso da vesícula seminal, observação que necessita de estudos posteriores para verificar o significado biológico.

REBOREDO, M. M.; LUCINDA, L. M.F.; ROCHA, C. B.; QUEIROZ, G. T.; FARIA, V. C.; VIEIRA, V. A. Evaluation of short-term exposure to *Caesalpinia ferrea* on male Wistar rats' vital organs, reproductive system and sperm production. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 25, p. 17-29, 2006.

Abstract: This study has evaluated the effect of the short-term exposure to *Caesalpinia ferrea* on male Wistar rats' vital organs, reproductive system and sperm production. Adult male Wistar rats (90 days old) were divided into two groups (control and treatment) of 15 animals each. The rats of the treatment group received, by gavage and once daily, 1 mL of *C. ferrea* aqueous extract at a dose level of 300 mg/kg of body weight, administered for five days. The control group received 1 mL of distilled water, following the same protocol as the treatment group. The animals were killed on the 19th day. After death, they underwent laparotomy for the removal and weighing of the following organs: testes, right epididymis, seminal vesicle, prostate, liver, kidneys, lungs, brain and the pituitary gland. Sperm were collected from the epididymal secretion of the right epididymis cauda. The results showed that the short-term administration of *C. ferrea* significantly reduced the seminal vesicle weight but did not significantly alter the body, vital and reproductive organs weights nor did it interfere with gamete production. In a preliminary assessment, the *C. ferrea* extract seemed to exert a possible toxic effect on the rat's reproductive system as evidenced by the weight loss of the seminal vesicle.

Key words: *Caesalpinia ferrea*. Wistar rat. Reproductive system.

AGRADECIMENTO:

Os autores agradecem à Prof^a Dr^a Magda Narciso Leite pelo apoio técnico com o material botânico.

REFERÊNCIAS

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A. Anti-ulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Medica**, v. 60, p. 118-120, 1994.

- BACCHI, E. M. et al. Anti-ulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Medica**, v. 61, p. 204-207, 1995.
- BALBACH, A. **As plantas que curam**. São Paulo: Tres Press, 1972.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. (Ed.). **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. cap. 1.5, p. 60-70.
- BLAZAK, W. F.; ERNST, T. L.; STEWART, B. E. Potential indicators of reproductive toxicity: testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time, and motility in Fischer 344 rats. **Fundamental Applied Toxicology**, v. 5, p. 1097-1103, 1985.
- CARVALHO, J. C. T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 175-178, 1996.
- CHANG, M. C.; GU, Z.; SAKSENA, S. K. Effects of gossypol on the fertility of male rats, hamster and rabbits. **Contraception**, v. 21, p. 461-469, 1990.
- DIDOLKAR, A. K. et al. Effect of sulfasalazine and its analogs on fertility in male rats. **Contraception**, v. 37, p. 539-547, 1988.
- DIXIT, V. P.; GUPTA, R. S.; GUPTA, S. Antifertility plant products: testicular cell population dynamics following solasodine (C27H43O2N) administration in Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Andrologia**, v. 21, p. 542-546, 1989.
- FERREIRA, D.; MEDEIROS, S. F. Influência dos fatores sócio ambientais sobre a qualidade do sêmen. **Reprodução & Climatério**, v. 15, n. 3, p. 128-132, 2000.
- HASHIMOTO, G. **Illustrated Encyclopedia of Brazilian Medicinal Plants**. ABOC-SHA, 1996. p. 94.
- HIREMATH, S. P. et al. Antiandrogenic effect of *Striga orobanchioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 56, p. 55-60, 1997.
- KHERA, K. S. Maternal toxicity – a possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology**, v. 29, p. 411-416, 1984.
- KIMMEL, G. L.; CLEGG, E. D.; CRISP, T. M. Reproductive toxicity testing: A risk assessment perspective. In: WITORSCH, R. J. (Ed.). **Reproductive Toxicology**. New York: Raven Press, 1995. p. 75-98.
- LIMA, E. C. et al. Atividade anti-fúngica de extratos de plantas medicinais sobre *Trichophyton*, *Microsporium* e *Epidermophyton* isolados de pacientes com dermatofitoses. 1994. Trabalho apresentado no **13º Brazilian Symposium in Medicinal Plants**, Ceará, Brazil, 1994.
- LINDER, R. E. et al. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. **Reproductive Toxicology**, v. 6, p. 491-505, 1992.
- LINDER, R. E.; STRADER, L. F.; REHNBERG, G. L. Effect of acute exposure to boric acid on the male reproductive system of the rat. **Journal of Toxicological Environment and Health**, v. 31, p. 133-146, 1990.
- LINDER, R. E. et al. Acute spermatotoxic effects of bromoacetic acids. **Fundamental Applied Toxicology**, v. 22, p. 422-430, 1994.
- MAHONY, M. C.; HODGEN, G. D. Toxic effects on the hypothalamus-anterior pituitary-gonadal axis, control on the male and female reproductive system, and related issues. In: WITORSCH, R. J. (Ed.). **Reproductive Toxicology**. 2nd ed. New York: Raven Press, 1995, p. 195-213.
- MANONAYAGI, S. et al. Effects of bamboo buds: structural and functional changes in the epididymis of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 25, p. 201-212, 1989.

MASON, J. M.; KANG, Y. J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**, 3rd ed. New York: Raven Press, 1994. cap. 27, p. 989-1034.

MORAES, G. E. S. **Espermocitograma**. Porto Alegre: Médica Missau, 1994. cap. 2, p. 61-93.

NAKAMURA, E. S. et al. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, p. 119-124, 2002a.

_____. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 135-137, 2002b.

QUEIROZ NETO, A. et al. Toxic effects of *Annona squamosa* seed extract in rats and swine. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 10, p. 11-15, 1997.

RAJASEKARAN, M. et al. Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, p. 115-121, 1988.

STASI, L. C. D.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNESP, 2002.

SOKAL, R. R., ROHLF, F. J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd ed. New York: WH Freeman, 1995.

ZENICK, H. et al. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach In: HAYES, A. W. (Ed.). **Principles and Methods of Toxicology**. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994. p. 937-988.

