

Avaliação da toxicidade aguda oral do extrato hidroalcoólico das folhas de pequi (*Caryocar brasiliense*) em camundongos

Dayanne Castro Trombetta
João Eduardo Pinto Pires
Márcio Galdino dos Santos
Diva Denelle Spadacci-Morena
Francisco Airton Pinto Pires

RESUMO

O ensaio de Toxicidade Aguda Oral (TAO) do extrato hidroalcoólico das folhas de *Caryocar brasiliense* foi avaliado em camundongos machos de acordo com Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) – Guideline 423, com o objetivo de identificar a dose tóxica e letal do extrato de *Caryocar brasiliense* por via oral. O extrato foi administrado por via oral em camundongos com 20g de peso corporal. Por 11 dias, com atenção as primeiras 24 horas, os animais foram observados quanto a alterações comportamentais ocasionadas pela ingestão do extrato. Após a eutanásia, fígado, baço, pâncreas, pulmões, rins e coração foram macro e microscopicamente avaliados e nenhuma alteração importante foi encontrada. O teste foi realizado com diversas doses, a dose de 2000mg/kg foi a única que levou animais a óbito nas primeiras 30 horas (2/3), o que de acordo com a OECD 423, permitiu classificar o extrato bruto das folhas do *Caryocar brasiliense* em classe toxicológica IV.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*. Toxicidade aguda oral. Plantas medicinais. Uso tradicional. Camundongo.

Evaluation of acute oral toxicity of hydroalcoholic extract of pequi (*Caryocar brasiliense*) in mice

ABSTRACT

The Acute Oral Toxicity test (TAO) of the alcoholic extract of the leaves of *Caryocar brasiliense* was evaluated in male mice according to Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) – Guideline 423, with the goal of identifying toxic and lethal dose the extract *Caryocar brasiliense* orally. The extract was orally administered in mice with 20g of body weight. For 11 days, with attention the first 24 hours, the animals were observed for behavioral changes caused by the ingestion of the extract. After euthanasia, liver, spleen, pancreas, lungs, kidneys and heart were grossly and histologically evaluated and no significant change was found.

Dayanne Castro Trombetta é bióloga, Mestre em Ciências do Ambiente pela Universidade Federal do Tocantins – Brasil.
João Eduardo Pinto Pires é professor do curso de Medicina Veterinária da Universidade Luterana do Brasil – Brasil.
Márcio Galdino dos Santos é professor do programa de mestrado da Universidade Federal de Tocantins – Brasil.
Diva Denelle Spadacci-Morena é pesquisadora do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan – Brasil.
Francisco Airton Pinto Pires é graduado em Química pela Universidade Estadual do Piauí – Brasil.

Veterinária em Foco	Canoas	v.11	n.2	p.95-103	jan./jun. 2014
---------------------	--------	------	-----	----------	----------------

The test was performed with different doses, a dose of 2000mg/kg was the one that led the animals died within first 30 hours (2/3), which according to OECD 423, allowed classifying crude extract from the leaves of *Caryocar brasiliense* in toxicity class IV.

Keywords: *Caryocar brasiliense*. Acute Oral Toxicity. Medicinal plants. Traditional use.

INTRODUÇÃO

A humanidade pôde perceber que, além de as plantas serem comestíveis, algumas eram dotadas de maior ou menor toxicidade e que, ao serem experimentadas no combate às doenças, revelaram, empiricamente, o seu potencial curativo (CAMPESATO, 2005). Antes chamadas de terapias alternativas ou tradicionais, o uso de plantas medicinais é bastante significativo principalmente nos países em desenvolvimento, por ser um recurso facilmente encontrado e de baixo custo. Surge das heranças históricas somadas à diversidade da flora, o difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica, a ampla comercialização em locais públicos, a influência das propagandas que prometem benefícios seguros e ainda da fraca atuação dos organismos estatais responsáveis pela vigilância sanitária (SILVA; RITTER, 2002).

O uso milenar e tradicional das plantas medicinais não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros (GALLO et al., 2000). Pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias agressivas e por essa razão, deve se respeitar seus riscos toxicológicos (AGRA et al., 2008; VEIGA JR, 2005). Há a necessidade de se conhecer sobre a toxicidade e as reações adversas da maioria das plantas medicinais é fundamental para que não sejam utilizadas de forma inadequada ou até concomitante com outros medicamentos alopáticos o que podem induzir a problemas graves (SILVEIRA, 2007; VEIGA JR, 2008). Um dos enganos mais comuns é julgar que um chá ou infusão de plantas medicinais é inofensivo e que pode ser ingerido sem indicação médica (GALLO et al., 2000; CLARKE et al., 2007). Portanto, identificar os efeitos desconhecidos, quantificar os riscos e mecanismos envolvidos são essenciais para tornar o uso das plantas medicinais mais seguro e eficaz (SILVEIRA et al., 2008).

Algumas plantas medicinais possuem efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo, uma vez que, seus constituintes podem chegar ao feto atravessando a placenta e gerando graves efeitos (BRASIL, 2002). A embriotoxicidade se refere à perturbação no desenvolvimento embrionário ou fetal, cujas dosagens não afetam o organismo materno; mas, quando ocorre a morte do embrião após a administração de doses tóxicas para a mãe, este fato deve ser considerado como um efeito tóxico da planta e essa característica é chamada de embriofetalidade (ARAÚJO, 1998). A teratogenia pode ter causas ambientais, físicas, biológicas ou químicas. Acredita-se que a exposição a determinadas plantas durante a gravidez seja responsável por cerca de 1% das más formações fetais (RODRIGUES et al., 2011). As drogas agem sobre diversas fases do processo reprodutivo, como fertilidade, embriogênese, organogênese, parto e com conseqüências graves para o recém-nascido, entretanto o risco teratológico é maior na organogênese (ARAÚJO, 1998). O aborto que significa privação ao nascimento pode ser classificado como espontâneo ou natural e provocado ou induzido. Muitas vezes o aborto é provocado pelo uso indiscriminado de

plantas medicinais em mulheres que desconhecem os possíveis efeitos causados durante a gestação.

Dentre as plantas reconhecidas como medicinais, o pequizeiro, é amplamente utilizada pela população tradicional para diversos fins, desde sua raiz até os frutos. Para tanto, estudos toxicológicos, são importantes para determinar o potencial de novas substâncias que podem causar danos à saúde (VALADARES, 2006).

Os testes de toxicidade são conduzidos antes do início dos ensaios farmacológicos e proporcionam uma avaliação preliminar das propriedades tóxicas de uma substância (PUCCI, 2009). Ainda, permitem avaliar a ideia errônea de que produtos derivados das plantas são isentos de efeitos tóxicos e adversos (CUNHA et al. 2009). Portanto, o propósito deste trabalho foi identificar a toxicidade aguda oral do extrato de *Caryocar brasiliense* para camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação taxonômica

Foram coletadas folhas jovens da árvore *Caryocar brasiliense* no Campus de Porto Nacional – UFT (Universidade Federal do Tocantins), Estado de Tocantins, no mês de setembro de 2012. Foram utilizadas apenas as folhas jovens, isto é, aquelas localizadas nas gemas terminais das ramificações, que foram identificadas e comparadas com as do Acervo da Universidade, por meio da exsiccata 6.022. A coleta foi autorizada pelo SISBIO (processo nº 34309-2).

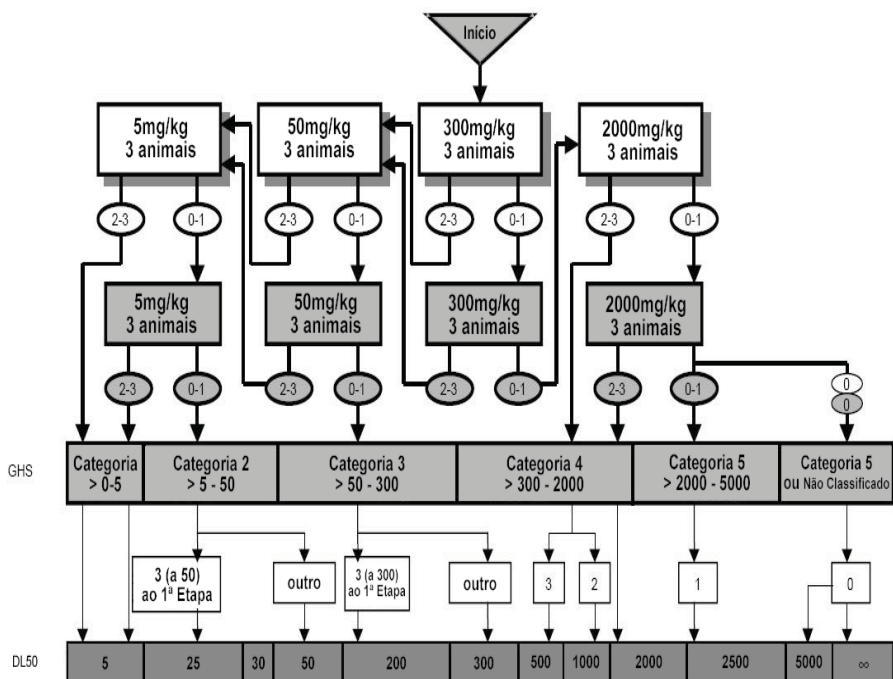
Preparação do extrato

As folhas do *C. brasiliense* permaneceram em estufa a 45°C por 7 dias, para desidratarem, e, em seguida, foram trituradas em moinho para obtenção do pó. Para obtenção do extrato, o pó foi totalmente submersos em uma solução hidroalcolólica (EtOH a 70%), e essa mistura permaneceu acondicionada em vidro hermeticamente fechado por 3 dias, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro, com o auxílio da bomba de vácuo, evaporada até que estivesse totalmente seca, num evaporador rotativo a 45 rpm, a 45°C, e depois liofilizada, alíquotada e armazenada a -20°C. No momento do uso, o extrato foi diluído (m/v) em óleo de milho Mazola®.

Teste de toxicidade aguda oral para o extrato das folhas do *C. brasiliense* – TAO 423

O teste seguiu as recomendações da Organization for Economic Co-operation and Development proposto em 2001 (OECD, 2001), Guidelines for the Testing of Chemical, Section 4 (Health Effects), Guideline 423 (Fig.1)

FIGURA 1– Etapas para o procedimento da toxicidade aguda segundo OECD423 -2001.



Foram utilizados 3 camundongos machos (*Mus musculus*, var. albino) por dosagem, pertencentes a linhagem Swiss, com 60 dias de idade e com peso de 20g, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram submetidos a jejum sólido por 3-4h, antes da administração do extrato da folha de *C. brasiliense*, por gavagem, e por mais 1h, após a administração.

Os animais foram alojados em gaiolas, por grupos de dosagem, receberam água e ração *ad libitum*, com fotoperíodos de 12/12 (claro-escuro) e mantidos a uma temperatura de 22-24°C.

De acordo com o guia OECD 423/2001 a toxicidade aguda oral foi determinada em etapas e seguiu respectivamente as concentrações de 300, 1000 e 2000 mg do extrato de *C. brasiliense*/kg de peso corpóreo, num volume final de 1mL/kg de peso corpóreo. Os animais receberam por via oral através de gavagem.

Os animais foram observados ininterruptamente nos primeiros 30 minutos, periodicamente durante 24h, com especial atenção às 4 primeiras horas, e diariamente, por um período de 11 dias, exceto nos casos em que o animal morreu ou foi submetido à eutanásia, em razão do seu bem-estar. Os parâmetros avaliados foram: piloereção, alteração da locomoção, contorções abdominais, respiração, tremores, convulsões, salivação, diarreia, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto caudal. O peso

dos animais foi registrado imediatamente antes da administração do extrato e, uma semana após e no final do mesmo. Ao final dos testes, os animais foram submetidos à eutanásia. Para tanto, foi utilizado o CO₂ comprimido em cilindro, aplicado em câmara anestésica adequada. Todos os animais, inclusive aqueles que morreram no decorrer dos testes, foram submetidos à necropsia e órgãos como rins, fígado, pulmões, baço e coração foram coletados para avaliação histológica. Para tanto, foram fixados em Bouin, desidratados em bateria alcoólica crescente, diafanizados, embebidos e incluídos em parafina. Cortes com aproximadamente 3µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina, e observados em microscópio de luz.

A utilização dos animais seguiu todas as recomendações da Comissão de Ética de Uso Animal do Instituto Butantan (CEUAIB n° 1091/13).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O teste de toxicidade aguda foi realizado utilizando a via oral já que não há relato do uso da folha de *Caryocar brasiliense* por alguma outra via de administração. Vale ressaltar que o teste de toxicidade aguda deve priorizar a via utilizada pelos humanos, ou seja, a via oral. Mesmo sendo espécies diferentes, é notório que a resposta dos camundongos frente à administração por gavagem não será a mesma daquela observada quando utilizada a via intraperitoneal, devido às diferenças existentes entre os perfis de absorção estomacal e intestinal como pH, superfície de absorção, motilidade intestinal, irrigação sanguínea (KLAASSEN; WATKINS, 2001).

A primeira dose administrada foi a de 300mg/kg do extrato bruto de *C. brasiliense*, pois como não se tinha quaisquer informações na literatura sobre a substância a ser administrada, o protocolo foi iniciado como recomendado pelo TAO/OECD 423. Esses animais sob observação por 11 dias e não apresentaram nenhum sinal de alteração comportamental ocasionado pela ingestão do extrato, sendo eutanasiados após o tempo decorrido (Tabela 1).

TABELA 1 – Análise corporal, comportamental, necropsial e óbito dos camundongos submetidos a ingestão da solução em óleo vegetal do extrato hidroalcoólico de *C. brasiliense* na toxicidade aguda em camundongos.

Dose (mg/Kg) N=3	Média de massa corporal inicial/final (g)	Ganho ponderal em 11 dias (g)	Alterações comportamentais			Óbitos		Análise necropsial
			Piloereção	Locomoção e tônus muscular	Dispneia	Morte Natural	Eutanasiado	
300	20 / 28	8	Ausente	Ausente	Ausente	0	3	Sem alterações macroscópicas
1000	20 / 24,5	4,5	Ausente	Ausente	Ausente	0	3	Sem alterações macroscópicas
2000	20 / 20	0	Presente	Presente	Presente	2	1	Sem alterações macroscópicas

Em seguida, foi utilizada a dose de 2000mg/kg, segundo recomendações da OECD 423 (2001), dissolvidos em 1mL/100g de peso corporal, onde foram observados sinais de alterações comportamentais ocasionados pela ingestão do extrato, como: piloereção em todos os animais testados, alteração da locomoção e dificuldade na respiração em dois animais, levando um dos animais foi a óbito após 24 horas da administração do extrato e o outro foi submetido a eutanásia por apresentar sinais de sofrimento. O animal restante apresentou os primeiros sinais de toxicidade após 23 horas da administração, revertendo os sinais 30 horas depois. Foi o único animal deste grupo a completar os 11 dias. Durante esse período, não houve alteração do peso corpóreo, permanecendo com 20g.

Para dar uma maior confiabilidade ao experimento, foi testada a dose de 1000mg/kg diluídos em 1mL/100g de peso corporal, realizado conforme protocolo anterior. Não foi observado nenhum sinal de alteração comportamental ocasionado pela ingestão do extrato, nem foi observada morte. Ainda, esses animais tiveram um ganho corpóreo médio de 22,5%, e no findar do tempo, todos os animais desta dose foram eutanasiados.

O ganho de massa corpórea foi inversamente proporcional à dose do extrato administrada. Os animais que receberam 300mg/kg e 1000mg/kg tiveram um ganho médio de 40% e 22,5%, respectivamente, em 11 dias. Entretanto, o animal restante, do grupo 2000mg/kg não houve alteração de massa, conforme tabela 1. Sabe-se que os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais, na toxicidade subaguda (TOFOVIC; JACKSON, 1999; RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002). A toxicidade sistêmica se manifesta através da redução nos consumos de água e ração, na diminuição do desenvolvimento ponderal, nas alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem, como a presença de pelos arrepiados (MELO, 2001). Outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (GONZALEZ; SILVA, 2003). O extrato bruto das folhas de *C. brasiliense* produziu alterações significativas nos parâmetros fisiológicos entre os grupos, com destaque para a redução do ganho de peso e desenvolvimento ponderal entre os animais, portanto, provoca toxicidade sistêmica moderada.

Com relação às observações histopatológicas realizadas nos três grupos, notou-se que no grupo em que foi administrada 2000mg/kg da dose do extrato, pode se perceber animais com alterações na integridade tecidual dos pulmões, rins e, principalmente no fígado (Tabela 2), não houve comparação macroscópica, por ter restado apenas 1 animal. Os animais dos demais grupos, não apresentaram alterações microscópicas anormais. No entanto, coração, fígado e pâncreas apresentaram alterações macroscópicas isoladas em alguns animais (Tabela 2).

TABELA 2 – Alterações micro e macroscópicas dos órgãos dos camundongos submetidos a diferentes doses do extrato de *Caryocar brasiliense*.

	300mg/kg	1000mg/kg	2000mg/kg
Fígado	Tonalidade clara em um ponto	Tonalidade escura e menor	Hemorragia subcapsular e parenquimatosa
Rins	Sem alterações	Grande em um animal e em outro apresentava manchas	Lesões microscópicas
Baço	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
Coração	Grande em um animal	Sem alterações	Sem alterações
Pulmão	Sem alterações	Sem alterações	Lesões microscópicas
Pâncreas	Grande em dois animais	Sem alterações	Sem alterações

CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Caryocar brasiliense* apresentou uma Dose Letal Média $DL_{50} = 1000$ mg/kg, o que permite classificar a substância na classe toxicológica IV, de acordo com a Tabela de classificação de risco toxicológico agudo segundo GHS – Globally Harmonised Classification System – OECD, 2001.

A determinação da toxicidade pode contribuir para o desenvolvimento de trabalhos futuros que necessitem utilizar o extrato hidroalcoólico da folha de *Caryocar brasiliense*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pelo auxílio financeiro e ao INSTITUTO BUTANTAN pelo aprimoramento da técnica e doação dos animais de experimentação.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASILIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Brasileira Farmacognosia*, v.18, p.472-508, 2008.
- ARAUJO, R. C. *Estudo toxicológico das drogas*. Correlação clinicopatologia. In: SILVA, P. *Farmacologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap 20, p.131-150, 1998.
- BRASIL. Resolução SES Nº 1757, de 18 de fevereiro de 2002. Contraindica o uso de plantas medicinais no âmbito do Estado do Rio de Janeiro e da outras providencias. *Diário oficial do Estado do Rio de Janeiro*, 20 fev., v.27, n.33. Parte I, 2002.

CAMPESATO, V. R. *Uso de plantas medicinais durante a gravidez e risco para malformações congênitas*. 2005. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

CLARKE, J. H. R.; RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. *Infarma*, v.19, n.1/2, p.41-48, 2007.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO-JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadeniumumbellatum* Pax. *Revista Brasileira de Farmagnosia*, v.19, n.2A, p.403-411, abr./jun. 2009.

GALLO, M.; SARKAR, M.; AU, W.; PIETRZAK, K.; COMAS, B.; SMITH, M.; JAEGER, T. V.; EINARSON, A. R. N.; KOREN, G. Pregnancy outcome following gestational exposure to Echinacea: a prospective controlled study. *Arch. Intern. Med.*, v.160, p.3141-3143, 2000.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. *Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária*. Porto Alegre: UFRS, p.179-198, 2003.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, III EJB. Absorção, distribuição e excreção dos tóxicos. In: *Toxicologia: a ciência básica dos tóxicos de casaret e doull*. 5.ed. McGraw-Hill, 2001. p.79-100.

MELLO, F. B. *Estudos dos efeitos de Lantanacâmara (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos*. 2001. Porto Alegre, 120p. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2001.

OECD Guideline for the Testing of Chemicals – n° 423 – Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, 2001.

PUCCI, L. L. *Avaliação da toxicidade oral aguda e as atividades diurética e antioxidante da Rudgeaviburnoides (CHAM.) BENTH. (CONGONHA DE BUGRE)*. 2009. Dissertação de mestrado. Goiânia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. 2009.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, A. O.; EL-HADIYAH, 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*. *Science Pharm.*, v.70, p.135-145, 2002.

SILVA, M. V.; RITTER, M. R. Plantas medicinais e tóxicas da Reserva Biológica do Lami, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Revista Botânica*, v.57, p.61-73, 2002.

SILVEIRA, P. F. *Perfil de utilização e monitorização de reações adversas a fitoterápicos do Programa Farmácia Viva em uma Unidade Básica de Saúde de Fortaleza-CE*. 2007. 141p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Brazilian of Pharmacognosy* v.18, n.4, p.618-626, out./dez. 2008.

TÉO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBBERMAN, A.; KIROPES, A. A 90-day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, v.179, p.183-196, 2002.

TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal functions in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *J. Cardiovasc Pharmacol* v.33, p.360-366, 1999.

VALADARES, C. V. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a era do teste DL50. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.3, n.2, p.93-98, 2006.