

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO VEGETAL *Lafoensia pacari* A. St.-Hil

Anne Francielle Silva Queiroz¹

Davi de Souza Melo¹

Dorcas F. dos Anjos Melo²

Rodrigo Irani Medeiros³

RESUMO: O uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobióticos sintético e sua preconização, ou autorização oficial do seu uso medicamentoso, deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias de que os riscos a que se expõem aqueles que a utilizam são suplantados pelos benefícios que possam advir. Desta feita, o objetivo deste foi avaliar a espécie vegetal *Lafoensia pacari* (pacari), quanto aos seus efeitos toxicológicos agudo, a fim de classificá-lo segundo os critérios do sistema harmonizado globalizados (GHS) da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development* OECD 423), e obter informações sobre as propriedades tóxicas do extrato aquoso de *L. pacari* (EAP), acerca dos riscos potenciais para a saúde, resultante da administração de doses repetidas e diárias por um período de 30 dias segundo as diretrizes da OECD 407. Os experimentos foram realizados em animais de laboratórios (ratos *Wistar* e camundongos *Swiss*), que foram anestesiados, no final dos experimentos, e o sangue colhido para a realização de exames bioquímicos e hematológicos; posteriormente, eutanasiados por deslocamento cervical e, submetidos à necropsia macroscópica. Como resultado, o EAP, no teste de toxicidade aguda não mostrou sinais de intoxicação e nem alterações fisiológicas, com DL₅₀ (dose letal mediana) estimada maior que 2000 mg/kg (classe GHS 5 da OECD). No ensaio de toxicidade subaguda, as doses de 100 e 200 mg/kg de EAP não produziram alterações dose-dependentes significativas nos parâmetros laboratoriais e fisiológicos, nem macroscópicas dos órgãos. Contudo, o uso crônico da planta *L. pacari* merece mais estudos.

PALAVRAS-CHAVE: *Lafoensia pacari*, toxicidade aguda, toxicidade crônica.

¹ Acadêmico do Curso de Farmácia da Faculdade União de Goyazes

² Coorientadora: Ms. Dorcas Fernandes dos Anjos

³ Orientador: Prof.^o.Dr.^o. Rodrigo Irani Medeiros, Faculdade União de Goyazes

Assessment acute and subacute toxicity of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil

ABSTRACT: The popular use, and even the traditional not sufficient to validate ethically medicinal plants as effective and safe medicines. Accordingly, medicinal plants are no different from any other synthetic xenobiotics and their advocating or official permission of his drug use, should be based on experimental evidence corroborative of the risks to which they expose those who use outweighed by benefits may arise. This time, the objective was to evaluate the plant species *Lafoensia pacari* (pacari), regarding their acute toxicological effects, in order to classify it according to the criteria of the globalized harmonized system (GHS) of OECD 423, and information about the properties toxic of extract acuoso of *L. Pacari* (EAP) of potential risks to health resulting from repeated dosing and daily for a period of 30 days according to OECD guidelines 407. The experiments were conducted in laboratory animals (rats and Swiss mice), which were anesthetized at the end of the experiments, and blood collected for conducting biochemical and haematological subsequently euthanized by cervical dislocation and necropsied macroscopic. As a result, the EAP, the acute toxicity test showed no signs of intoxication and even physiological changes, with LD50 (median lethal dose) estimated greater than 2000 mg / kg (GHS class 5 OECD). In subacute toxicity testing, doses of 100 and 200 mg / kg produced no EAP dose-dependent significant alterations in physiological and laboratory parameters or macroscopic bodies. However, chronic use of the plant *L. pacari* deserves further study.

PALAVRAS-CHAVE: *Lafoensia pacari*, acute toxicity, chronic toxicity.

INTRODUÇÃO

As plantas há muito fazem parte da medicina popular na evolução do ser humano, sendo consideradas os primeiros recursos terapêuticos dos povos. Atualmente, dentre a população mundial, segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde) 80% usam ou já usaram ervas para tratar e/ou curar alguma enfermidade.

Nos Biomas brasileiros podem ser encontradas milhares de espécies vegetais com alguma atividade medicinal, das quais centenas estão presentes na vegetação do cerrado. O Cerrado é um bioma de clima tropical, tipicamente marcado pela imensidão territorial (Silva et al., 2012), sua diversidade de espécies vegetais nativas proporcionam várias utilidades, desde uma exploração econômica (como alimentícias; oleaginosas; fibrosas e frutíferas), até à medicinal, na cura das mais variadas doenças que acometem o homem e animais domésticos (Ribeiro et al., 1994), destacando-se algumas espécies, como a Sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel), o Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Mart), o Pacari (*Lafoensia pacari* A. St.-Hil), o Araçá (*Psidium anaca.*), a Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomez), o Murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich), o Coco Buriti (*Mauritia vinifera* Mart.), a Macaúba (*Acrocomia aculeata* Mart.), o Baru (*Dipterix alata* Vog), Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC).

1. PLANTA

1.1 – CARACTERIZAÇÃO DA *Lafoensia pacari* A. St.-Hil

Entre as espécies medicinais do cerrado, destaca-se a *L. pacari*, da família Lythraceae. Uma planta disseminada em ecossistemas de florestas de galeria e de altitude, como no caso do cerrado, é também encontrada nos estados do Amapá e Rio Grande do Sul, além do Paraguai e da Bolívia (Santos, 2006, Galdino et al., 2010), bem como na arborização de ruas e praças; possui diversas sinonímias populares como dedaleiro, dedal, mangabeira-brava e pacari (Mundo & Duarte, 2007). É uma árvore que pode atingir 25 m de altura, porém na região do cerrado consegue em torno de 1 a 10 m de altura. Possui tronco reto ou levemente tortuoso; ramificação cimosa,

em forquilha com copa arredondada, umbeliforme, larga e densifoliada com ramos terminais jovens avermelhados. As folhas são opostas, simples, oblongas ou obovadas de textura coriácea. Suas flores são grandes com receptáculo desenvolvido (Joly, 1987); com até 16 pétalas livres; de cor branca ou amarelada (Silva Júnior, 2006; Santos, 2006). O fruto é seco, deiscente (Silva Júnior, 2006; Santos, 2006), do tipo cápsula semilenhosa, semiglobosa, com 4 a 8 cm de comprimento, com ápice arredondado, terminando em cone, tendo internamente, no fundo, a placenta seminífera, pardo-escura. O fruto em forma de pião pesa 6,1 a 40,6 g. As sementes são oblongas, aladas, com testa expandida em duas asas laterais de amarelo a pardo-avermelhada, planas, e regularmente inseridas na placenta basal, tendo o hilo numa das extremidades, não apresentam endosperma (Santos, 2006).

Popularmente é usada como febrífugo, cicatrizante, tônico (Mundo & Duarte, 2007), e anti-diarréico (Coelho et. al., 2005). Estudos realizados por Sólón et. al. (2000) que comprovaram a atividade antioxidante do extrato metanólico da casca do caule e também determinaram através de métodos cromatográficos (cromatografia líquida de alta eficiência) que o ácido elágico está presente nas cascas e é o principal responsável pela potente atividade antioxidante do extrato analisado e suas frações. Rogério et al. (2003) demonstraram que o extrato aquoso da casca do caule inibe a liberação de interleucina 5 (IL-5) em modelo de toxocaríase induzida em camundongos sem apresentar atividade antiparasitária. Rogério (2006) determinou que o extrato aquoso da casca do caule do pacari apresenta atividade anti-inflamatória, antinoceptiva e anti-dematogênica em modelo murino, comparando com padrão de ácido elágico, propondo assim, que este composto pode ser o responsável, também, pelas atividades farmacológicas comprovadas no estudo. Menezes (2006) demonstrou que o extrato metanólico da casca do caule do pacari não apresenta atividade na erradicação de *Helicobacter pylori* em estudo clínico randomizado duplo cego, porém, este mesmo estudo mostrou que o tratamento com este mesmo extrato foi capaz de diminuir a sintomatologia dispéptica de grande parte dos pacientes tratados.

Guimarães (2008) demonstrou que o extrato etanólico das folhas de *L. pacari* apresenta atividade anti-inflamatória e analgésica, assim como o extrato da casca do caule, descartando-se a possibilidade da atividade antinoceptiva

estar relacionada a efeitos no sistema nervoso central, tais como ação ansiolítica, depressora ou miorelaxante. Galdino et. al. (2009) demonstraram que o extrato etanólico da casca do caule de *L. pacari* e a fração clorofórmica obtida deste extrato apresentam atividade tipo-antidepressiva em camundongos, mostrando um efeito sobre o sistema nervoso central (SNC). Nesse mesmo trabalho, foi confirmada a presença de ácido elágico tanto no extrato etanólico bruto quanto na fração clorofórmica, além da presença de flavonóides em ambas as amostras, e de saponinas no extrato etanólico da casca do caule.

Os principais constituintes químicos descritos para *L. pacari* pertencem, na sua maioria, à classe dos compostos fenólicos, tais como os taninos, os flavonóides, e o ácido elágico. Além dos compostos fenólicos, Sólón et. al. (2000) e Galdino et. al. (2009) descreveram a presença de saponinas em extratos obtidos da casca do caule de *L. pacari*. Sampaio e Leão (2007) descreveram a presença de saponinas também nas folhas desta planta

2. TOXICIDADE

2.1 – TOXICIDADE AGUDA

Estudar novos compostos candidatos a fármacos ou a fitoterápicos, independe da via de administração e, vários ensaios devem ser feitos, inclusive o de toxicidade aguda. Empregado para avaliar e verificar a capacidade que uma substância possui em causar algum prejuízo à saúde humana (Valadades, 2006). Ao se avaliar a toxicidade aguda de uma substância, além de detectar o potencial tóxico sistêmico em âmbito estritamente agudo, a DL₅₀ (dose letal mediana) é estimada e a substância classificada de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade. Por ser um parâmetro estatístico, a DL₅₀ proporciona verificar qual dose provocará a morte em metade dos animais experimentais estudados, além de ajudar estabelecer intervalos de segurança (Valadades, 2006 e Pires, 2010).

É no ensaio agudo que se avalia o *screening* hipocrático, o qual fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo (Malone & Robichaud, 1962; Malone & Robichaud, 1983), onde o

parâmetro mortalidade poderá ser observado a partir do estado moribundo do animal em 24 h, e nos 14 dias consecutivos. O teste de toxicidade aguda convencional foi descrito, em princípio, na Diretriz 401 da OECD, revisado e substituído pela de nº 423 da OECD (Valadades, 2006).

No Brasil, as avaliações de toxicidade para produtos candidatos a fitoterápicos, deverão ser utilizadas nos experimentos com animais: doses suficientes para se observar efeito adverso e estimar a DL₅₀, com no mínimo seis machos e seis fêmeas por dose (BRASIL, 2004). Alternativamente, a OECD preconiza uso de dose limite de 2000 mg/kg, suficiente para estimar DL₅₀, e apenas três animais de ambos os sexos (OECD, 1996).

2.2 – TOXICIDADE SUBAGUDA

Exposições repetidas a substâncias químicas caracteriza estudos subagudos de dose/resposta repetidas, ou seja ensaios de toxicidade subaguda proporcionam obter informações sobre as propriedades tóxicas de extratos (e frações) de plantas, acerca dos riscos potenciais para a saúde, resultante da administração de doses repetidas e diárias por um período de 28 a 30 dias.

Os níveis de dose são estabelecidos de acordo com os testes de atividade geral (*screening* hipocrático) e com a estimativa da DL₅₀ ou, ainda, quando existem informações sobre doses necessárias para exercer o efeito farmacológico nos animais de experimentação ou em humanos. Pelo menos uma dose (a maior) ou até três doses, suficientemente espaçadas para mostrar diferenças na gradação dos efeitos tóxicos, podem ser empregadas. A Diretriz 407 da OECD descreve todos os cuidados para realização deste teste (OECD, 1999).

3. OBJETIVOS

Observar que a espécie *Lafoensia pacari* (pacari) tem seu uso bastante difundido pela população, surge a necessidade de realizar estudos que venham esclarecer se a mesma possui algum poder tóxico.

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade aguda e subaguda do extrato aquoso do *L. pacari* (obtido do súber de *L. pacari*) a ser produzido pelo Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais-UFG (LPPN-UFG), coordenado pelo Prof. Dr. José Realino de Paula.

3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- 1: Realizar avaliação comportamental em ratos e camundongos, machos e fêmeas (*screening* hipocrático);
- 2: Realizar ensaios de toxicidade aguda (dose única; 14 dias) em ratos e camundongos.
- 3: Realizar ensaios de toxicidade subaguda (dose múltipla, 30 dias) em ratos.

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAL BOTÂNICO

O extrato aquoso de *L. pacari* (EAP), foi fornecido, preparado e padronizado, pelo Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais-UFG (LPPN-UFG), onde as amostras foram dessecadas em estufa a 40°C com ventilação forçada, triturada posteriormente em moinho de facas. Pulverizado e acrescido de água a 100°C por 30 minutos e fazendo agitações a cada 10 minutos. Em seguida o extrato foi filtrado a vácuo para posterior concentração no liofilizador por cerca de 20 h, até obtenção do extrato aquoso bruto liofilizado.

4.2. DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS

Para o ensaio de toxicidade aguda foram utilizados 6 camundongas *Swiss (Mus musculus)*, pesando entre 35 a 42 g e 6 ratas *Wistar (Rattus norvegicus)* com peso entre 200 e 230 g. Para o ensaio de toxicidade subaguda, foram empregados 24 ratas *Wistar*, com peso entre 180 a 200 g. Todos provenientes do Biotério Central da UFG, mantidos na Sala de Experimentação Animal da Faculdade de Farmácia da UFG. Permaneceram em gaiolas coletivas de polipropileno, com tampa de aço inoxidável, periodicamente limpas e, em salas separadas por espécies; com controle de temperatura em 25°C ± 2°C, manutenção de ciclo claro/escuro de 12 h, recebendo ração da marca Purina® e água filtrada à vontade. O protocolo

experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA, da UFG, sob o nº 068/2012, que está em anexo. Todos os animais foram tratados em conformidade com os princípios definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), obedecendo também, aos preceitos da legislação brasileira (Lei Arouca - Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008), proporcionando condições de vida adequadas às espécies, contribuindo para sua saúde, conforto e bem-estar.

Em princípio, todos os animais foram submetidos a um período de adaptação por uma semana, com água e alimento à vontade e, posteriormente, foram subdivididos em grupos de acordo o procedimento experimental.

O extrato foi diluído em água destilada e administrado por gavagem, via peroral (p.o) em dose única para todos os grupos tratados.

4.3. DESENHO EXPERIMENTAL

4.3.1 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA ORAL-TESTE DE DOSE ÚNICA – Método de Classes

O teste de toxicidade aguda oral foi realizado segundo metodologia descrita no Guia 423 das diretrizes da OECD, 1996. Todo o procedimento atendeu às exigências da RDC 48 de 16 de março de 2004 da Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria do Ministério da Saúde (ANVISA/MS), (Brasil, 2004). A dose inicial, selecionada entre as doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, foi aquela mais propensa a produzir mortalidade.

As espécies de roedores (camundongas e ratas) foram subdivididas em dois grupos com três animais cada, sendo **C1** e **R1** o grupo controle de camundongas e ratas, respectivamente, que receberam água destilada p.o. E os grupos, **C2** (camundongas) e **R2** (ratas), recebendo dose máxima de 2000 mg/kg por peso corpóreo (p.c) EAP, respectivamente, administrados em uma única vez por gavagem. Cada animal foi observado por 24 h e, mantidos sob observação por 14 dias. A classificação da substância administrada é feita de acordo com o Globally Harmonised System. Uma das três ações será requerida: parar no teste que atribui a classificação do risco apropriado; testar em uma dose fixa maior ou em uma menor.

4.3.2. TESTE DE TOXICIDADE SUBAGUDA

Para a avaliação da toxicidade subaguda do EAP a metodologia descrita está no Guia 407 das diretrizes da OECD, 1999. Todo procedimento atendeu às exigências da RDC 48 de 16 de março de 2004 da ANVISA/MS (Brasil, 2004).

Os animais foram acondicionados em gaiolas semi-metabólicas, sendo 4 grupos de 6 animais cada. Um grupo controle (**G1**), recebendo água filtrada por gavagem, um grupo (**G2**) tratado com 100 mg/kg de EAP, um grupo (**G3**) tratado com 200 mg/kg de EAP e, por último um grupo satélite (**G4**) também com dose 200 mg/kg (grupo que fica mais 14 ou 15 dias sem tratamento, para verificar se há reversão dos sinais de toxicidade, quando houver). Os animais tratados receberam doses diárias por gavagem durante 30 dias, sendo observados durante as administrações.

4. 4. PARÂMETROS AVALIADOS

Na avaliação da toxicidade aguda, aplicou-se o “*screening*” hipocrático (análise comportamental sistemática) nos períodos de 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h, e a cada 24 h por 14 dias, onde os parâmetros observados foram (atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta aperto cauda, contorção, posição trem posterior, reflexo endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte). Os sinais de toxicidade, a época do seu aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos foram anotados, tabulando-os numa escala de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso), para posterior análise.

Por outro lado, no ensaio de toxicidade subaguda, os principais parâmetros observados foram, nos grupos experimentais (**G2**, **G3** e **G4**) e no grupo controle (**G1**): hemograma completo e análises bioquímicas de sangue (aspartato-aminotransferases (AST), alanina- aminotransferases (ALT), uréia, creatinina, sódio e potássio), realizadas no Laboratório Rômulo Rocha .

Durante todo o experimento foi avaliado massa corporal, consumo de água e ração, e produção de excretas antes e durante o experimento, além do

peso relativo dos órgãos. O cálculo final do peso relativo dos órgãos de cada animal foi realizado dividindo-se o peso de cada órgão (g) pelo peso corporal de cada animal no dia da coleta, multiplicando-se o resultado por 100. O resultado foi expresso em g/100 g de peso vivo (g/100g p.v.).

Ao término do período de observação (14 dias no ensaio agudo, 30 e 45 dias no ensaio subagudo), os animais foram anestesiados e eutanasiados e seus órgãos internos foram avaliados macroscópica e microscopicamente (histopatologia), após fragmentos destes órgãos serem fixados em formol tamponado 10% por 24h, embutidas em blocos de parafina, seccionadas à 5 µm e corados com hematoxilina e eosina (Junqueira, 1983; OECD, 1996; Brasil, 2004). A principal finalidade da análise histopatológica é avaliar a integridade tecidual dos órgãos extirpados, com investigação dos principais parâmetros como: lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose e apoptose), infiltração de leucócitos, congestão, extravasamento de sangue e fibrose.

4.5. MÉTODO DE EUTANÁSIA

Ao final de cada ensaio, após quatorze dias de análise toxicológica aguda, 30 e 45 dias de avaliação da toxicidade subaguda, todos os grupos foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina, sendo 8,75 mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100 mg/mL), conforme protocolo da *Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education* (Flecknell, 1996; Kohn, et al., 1997).

O sangue foi coletado por punção cardíaca e, em seguida os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O fígado, o estômago, pulmão, coração e os rins foram retirados, pesados e fixados em formol tamponado a 10%. Cada amostra de sangue foi centrifugada por 10 min a 3000 r.p.m. e o plasma separado para posterior análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas de 1 a 6 apresentam os resultados observados de acordo com os parâmetros estabelecidos para análise.

Tabela 1 -

	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Produção de excretas (g)
R1	77,14 ± 18,82	46,42 ± 11,04	33,90 ± 13,84
R2	78,80 ± 12,30	42,23 ± 5,36	34,00 ± 9,69
C1	19,58 ± 4,84	16,61 ± 9,66	11,59 ± 8,17
C2	17,49 ± 2,03	14,27 ± 1,39	10,91 ± 3,07

Dados expressos em média ± desvio padrão.

Parâmetros observados durante 14 dias, nos grupos de ratas (R) e camundongas (C), tratadas com veículo (R1 e C1) e tratadas com dose única de 2000 mg/kg de EAP (R2 e C2): consumo de água (mL), consumo de ração (g) e produção de excretas (g).

Tabela 2 -

Parâmetros avaliados	Grupo (média n=3)	Tempo (horas)							Tempo (dias)			
		0	0,5	1	2	4	8	24	3	7	10	14
Atividade Geral	R1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	R2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2
Resposta ao aperto da cauda	R1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	R2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2
Reflexo auricular	R1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	R2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2

Score: 4: intenso; 3: moderado ;2: pouco; 1: raro e 0: ausente.

Parâmetros relacionados ao "screening hipocrático", após administração oral em dose única de EAP, em ratas, na dose de 2000 mg/kg (R2). O controle (R1) recebeu água destilada por gavagem.

Tabela 3 -

	Massa corpórea (g)		Evolução Ponderal (%)	Massa do fígado	
	Inicial	Final		Absoluto (g)	Relativo (g/100g)
R1	192 ± 5,55	212 ± 9,62	12,94 ± 2,54	7,94 ± 1,31	3,94 ± 2,76
R2	170 ± 0,81	192 ± 3,55	10,19 ± 7,41	8,53 ± 0,83	4,76 ± 2,33
C1	43 ± 4,0	44 ± 0,0	2,37 ± 1,31	1,82 ± 0,26	4,14 ± 0,59
C2	39 ± 1,24	34 ± 2,05	-12,39 ± 7,88	1,76 ± 0,44	5,0,7 ± 1,12

Dados expressos em média ± desvio padrão.

Massa inicial e final, evolução ponderal e peso absoluto e relativo do fígado de ratas (R) e camundongas (C) tratadas com 2000 mg/kg do EAP (R2 e C2) e tratados com água destilada (R1 e C1), na toxicidade aguda.

Tabela 4 -

	AST (U/L)	ALT (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Na⁺ (U/mL)	K⁺ (U/mL)
G1	97 ± 26,7	52 ± 22,7	45 ± 3,8	0,30 ± 0,1	150 ± 7,0	3,2 ± 0,2
G2	128 ± 35,6	54 ± 5,4	46 ± 6,4	0,36 ± 0,1	149 ± 3,8	4,4 ± 2,1
G3	113 ± 33,8	56 ± 14,9	47 ± 2,2	0,41 ± 0,2	148 ± 3,4	4,5 ± 1,4
G4	89 ± 21,7	45 ± 13,8	53 ± 7,1	0,44 ± 0,1	145 ± 10,2	3,7 ± 0,8

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Dosagem de AST (aspartato-aminotransferase), ALT (alanina-aminotransferase), ALP (fosfatase alcalina), Na⁺ (sódio), K⁺ (potássio), uréia e creatinina no soro de ratas tratadas com veículo (G1) e com diferentes doses do EAP (100 mg/kg – G2 e 200 mg/kg – G3) e satélite (G4 – 200 mg/kg).

Tabela 5 –

	GV (103 / mm³)	HCT (%)	GB (106 / mm³)	LYM (%)	MON (%)	GRA (%)
G1	4,69 ± 0,09	25,96 ± 0,77	3,28 ± 0,34	68,81 ± 5,18	8,48 ± 1,62	22,70 ± 4,73
G2	4,29 ± 0,35	24,05 ± 1,86	2,73 ± 1,12	80,01 ± 5,77	9,58 ± 2,26	13,31 ± 5,80
G3	4,39 ± 0,22	24,26 ± 1,21	2,76 ± 1,20	70,84 ± 4,62	9,58 ± 2,26	19,58 ± 5,55
G4	7,47 ± 1,13	42,20 ± 6,82	2,86 ± 0,79	67,15 ± 6,61	12,63 ± 5,20	18,98 ± 4,19

Legenda: GV – glóbulos vermelhos; HCT – hematócrito; GB – glóbulos brancos; LYM – linfócitos; MON – monócitos; GRA – granulócitos. Valores expressos como média ± desvio padrão.

Hemograma das ratas dos grupos: tratado com veículo (G1), tratado com diferentes doses do EAP (100 mg/kg – G2 e 200 mg/kg – G3) e satélite (G4 – 200 mg/kg).

Tabela 6 –

	Volume de urina / dia (mL)	Produção de fezes / dia (g)	Consumo de água / dia (mL)	Consumo de ração / dia (g)
G1	4,42 ± 0,36	5,88 ± 0,71	35,82 ± 6,91	15,31 ± 1,28
G2	5,77 ± 0,52	6,12 ± 0,40	36,21 ± 1,92	14,34 ± 1,24
G3	5,08 ± 0,76	5,97 ± 0,56	32,72 ± 1,93	17,26 ± 0,86
G4	4,80 ± 0,44	5,76 ± 0,34	31,95 ± 2,40	16,95 ± 0,70

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Parâmetros avaliados durante 30 e 45 dias de tratamento com o EAP em ratas.

Avaliar a toxicidade de vegetais implica verificar por meio de metodologias a capacidade dos mesmos, em proporcionar algum prejuízo à saúde humana (Valadares, 2006; Zatta et al, 2009). O vegetal *Lafoencie pacari*, apesar de ser muito utilizado, estudos referentes aos riscos pela via oral, e estudos farmacológicos são escassos, desta feita, a presente investigação foi realizada para estimar os limites de segurança da administração oral do extrato de suas folhas, através da avaliação toxicológica em roedores. Por conseguinte, neste estudo os ensaios toxicológicos agudo e subagudo do EAP, tanto para ratas como camundongas, não ocasionou a morte de nenhum animal e, não foram observadas diferenças significativas em comparação ao grupo controle (R1 e C1) na toxicidade aguda e (G1) na toxicidade subaguda, nos hábitos fisiológicos diários (consumo de água e ração e a produção de excretas (fezes e urina) entre os grupos tratados (R2, C2, G2, G3 e G4), respectivamente (Tabela 1 e 6).

Durante os experimentos agudo e subagudo, nenhum animal demonstrou mudanças comportamentais anormais, sendo encontrada pelo *screening* hipocrático da toxicidade aguda, uma leve redução na atividade geral (score 1), assim como na redução da sensibilidade (score 1), nas primeiras 24 horas (tabela 2), normalizando a posteriori. O *screening* hipocrático é um ensaio de triagem prévia empregado para verificar e avaliar o funcionamento fármaco-toxicológico da substância em estudo (Cunha et al, 2009).

Sinais de toxicidade sistêmica podem ser definidos pela diminuição considerável no consumo de água e ração, associado a alterações comportamentais, apatia, além da redução da massa corpórea e da evolução ponderal (Cunha, 2009). Porém em nosso ensaio, na evolução ponderal das ratas e das camundongas tratadas com 2000 mg/kg de EAP, não houve diferenças significativas nos pesos relativos e absolutos do fígado, com redução em torno de 12% da massa corpórea para o grupo C2, comparado ao seu controle (C1), sem caracterizar toxicidade (Tabela 3). A necropsia dos animais não evidenciou nenhuma alteração macroscópica que justificasse o estudo histopatológico dos órgãos selecionados para análise.

Alterações hematológicas e bioquímicas significantes são outros parâmetros que identificam, na análise de toxicidade subaguda, sinais de intoxicação (Cunha, 2009). No entanto, observando os resultados de nosso

estudo, no exame bioquímico (Tabela 4) não foram observadas mudanças significativas quando comparado ao controle (G1), sendo identificado na enzima hepática (AST) uma leve alteração de até 31,95% na dose de 100 mg/kg (grupo G2), que normalizou com a parada no uso do EAP (grupo satélite - G4), comparados ao controle (G1), respectivamente. Presença de lesão hepática só é confirmada quando da identificação de alterações em ambos marcadores, AST e ALT, que em condições normais, estão em baixas concentrações no sangue, não condicionando patologia quando apenas uma enzima esteja alterada (MOTTA, 2009; LEE et al., 2012).

Houve aumento de 50,27% nos valores dos glóbulos vermelhos (GV) e 62,55% do hematócrito (HCT), para o grupo satélite (G4) comparado ao controle, G1 (Tabela 5), podendo ser explicado pela diminuição do estresse que era ocasionado pela administração diária do extrato, bem como o incômodo das observações dos parâmetros fisiológicos. Tais atitudes do pesquisador podem ocasionar alterações metabólicas e fisiológicas que interferem nos parâmetros alterados, a maioria deles relacionados diretamente aos hábitos alimentares.

6.CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada, o extrato aquoso de *L. pacari* não produziu sinais de intoxicação e nem alterações fisiológicas, motoras ou comportamentais nas doses administradas (p.o.) aos animais. Ou seja, possui baixa toxicidade aguda se usado por um período curto, ou mesmo a longo prazo. O valor da DL_{50} foi estimado em maior que 2.000 mg/kg, podendo ser enquadrada na Classe 5 de toxicidade, segundo a GHS, sendo considerada de baixa toxicidade, contudo, o uso crônico da planta *L. pacari* merece mais estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RE nº 90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de março de 2004^a

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

COELHO, F. B. R.; DAL BELO, C. A.; LOLIS, S. F.; SANTOS, M. G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada na comunidade do Jalapão - TO. *Revista Eletrônica de Farmácia*, Goiânia, suplemento v. 2, p. 52-55, 2005.

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 *Synadenium umbellatum* Pax. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 19 (2A): 403-411, 2009.

FLECKNELL, P. Laboratory animal anesthesia. New York: Academic Press, 1996.

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M; SOUSA, F. B.; FERREIRA, R. N.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Central activities of hydroalcoholic extract from *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. stem bark. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 46, n. 3, p. 455-462, 2010.

GUIMARÃES, H. A. Avaliação farmacológica do extrato etanólico das folhas de *Lafoensia pacari* A. St.-Hill. (pacari) quanto ao seu potencial analgésico e anti-inflamatório. 2008. 79f. Dissertação (Mestrado em Biologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2008.

JOLY, A.B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1987. 777p.

JUNQUEIRA, LCU; JUNQUEIRA, LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.
KOHN, D. F. et al. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. New York: Academic Press, 1997.

KOHN, D. F. et al. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. New York: Academic Press, 1997.

LEE, T. H.; KIM, W. R.; POTERUCHA, J. J. Evaluation of Elevated Liver Enzymes. *Clin Liver Dis* 16 () 183–198, 2012

MALONE MH, ROBICHAUD RC. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia* v. 25, p. 320-332, 1962.

MALONE MH, ROBICHAUD RC. The pharmacological evaluation of natura products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 8, p. 127-147, 1983

MENEZES, V. M. Avaliação do uso terapêutico do extrato de *Lafoensia pacari* St. Hil. Mangava-Brava na erradicação do *Helicobacter pylori*: Ensaio clínico randomizado duplo cego. 2006. 73 f. Tese (Doutorado em Medicina Interna e Terapêutica). Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2006.

MOTTA, V. T. Bioquímica Clínica para Laboratório: Princípios e Interpretações – Enzimas. v. 9, p. 90 – 120, 5 ed. Editora Medbook, 2009.

MUNDO, S. R.; DUARTE, M. R. Morfoanatomia foliar e caulinar de dedaleiro: *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, v.26, n.04, p. 522-529, 2007.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, OECD. Guidelines for testing of Chemicals, Guideline 423, Paris, 1996.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, OECD. Guidelines for testing of Chemicals, Guideline 407, Paris, 1999.

PIRES JUNIOR, H. B. Efeitos toxicológicos agudos de extrato de frutos verdes de *Melia azedarach* (MELIACEAE) em ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculares*) e *Artemia salina*. 2010. 70f. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

RIBEIRO, J.F.; FONSECA, C.E.L.; ALMEIDA, S.P. Espécies arbóreas de usos múltiplos da região do cerrado: caracterização botânica, uso potencial e reprodução. In: CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 1. 1994, Porto Velho. Anais. Porto Velho: Colombo, 1994. p.335-355. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 27).

ROGÉRIO, A. P. Estudo da atividade antiinflamatória, analgésica, anti-edematogênica e antipirética do extrato de *Lafoensia pacari* e do ácido elágico. 2006. 186f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2006.

ROGÉRIO, A. P.; SÁ-NUNES, A.; ALBUQUERQUE, D. A.; ANÍBAL, F. F.; MEDEIROS, A. I.; MACHADO, E. R.; SOUZA, A. O.; PRADO Jr., J. C.; FACCIOLI, L. H. *Lafoensia pacari* extract inhibits IL-5 production in toxocaríasis. *Parasite Immunology*, v.25, p. 393-400, 2003.

SAMPAIO, B. L.; LEÃO, D. T. Estudo farmacognóstico de *Lafoensia pacari* St.-Hil. (Lythraceae). 2007. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso de graduação

(Bacharelado em Farmácia). Curso de Farmácia da Universidade Estadual de Goiás – Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas. Anápolis, 2007

SANTOS, L. W. Estudos ecológicos e agrônômicos de *Lafoensia pacari* st.hil. (Lythraceae) na região de Barra do Garças-MT. 2006. 61f.

SILVA, S. M. F. Q.; PINHEIRO, S. M. B.; QUEIROZ, M. V. F.; PRANCHEVICIUS, M. C.; CASTRO, J. G. D.; PERIM, M. C. S.; CARREIRO, C. Atividade in vitro de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. *In vitro* activity of crude extracts of two plant species in the Cerrado on yeast of the *Candida* SPP variety. *Ciência & Saúde Coletiva*, 17(6):1649-1656, 2012.

SILVA JÚNIOR, M.C. 100 Árvores do cerrado: guia de campo. Brasília: Ed. Rede de sementes do cerrado, 2005. 278f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária Universidade Federal de Mato Grosso. 2006.

SÓLON, S.; LOPES, L.; SOUSA Jr., P. T.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.72, p. 173-178, 2000.

VALADARES, M. C. Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DL50. *Revista Eletrônica de Farmácia* v. 3, n 2, p. 93-98, 2006.

ZATTA, D. T.; PIMENTA, F. C. P.; TRESVENZOL, L. M. F.; FIUZA, T. S.; BARA, M. T. F.; CUNHA, L. C.; PUCCI, L. L.; GARROTE, C. F. D.; OLIVEIRA, F. N. M.; PAULA, J. R. Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*. *Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de Pseudomonas aeruginosa e da Toxicidade Aguda das folhas da Jacaranda decurrens*. v. 28 (4): 485-9, (2009).

ANEXOS

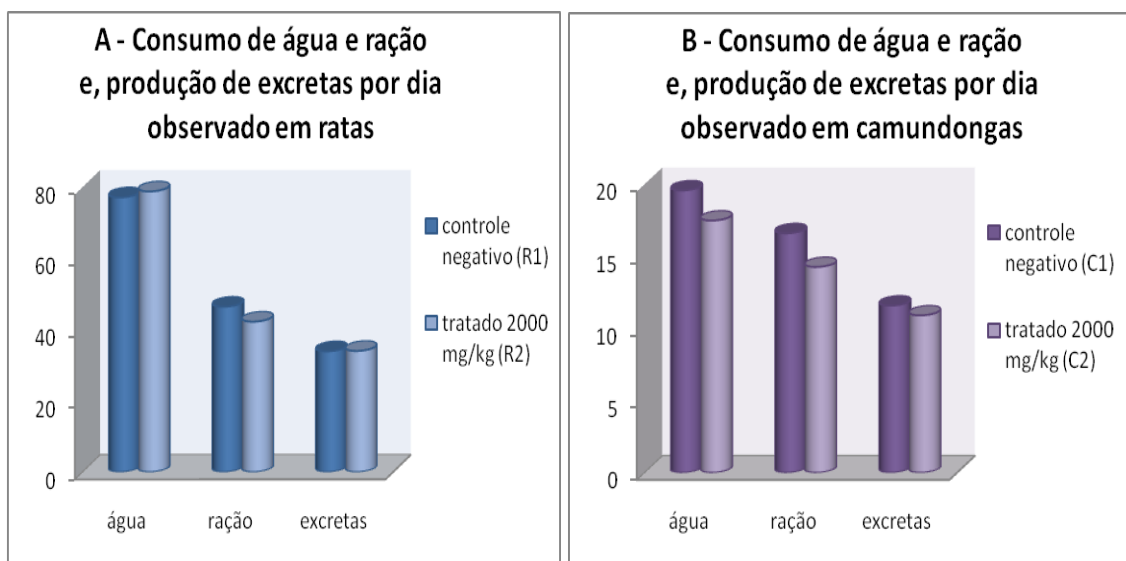


Figura 1 - Parâmetros observados durante 14 dias, nos grupos de ratas (R) e camundongas (C), tratadas com veículo (R1 e C1) e tratadas com dose única de 2000 mg/kg de EAP (R2 e C2): consumo de água (mL), consumo de ração (g) e produção de excretas (g).

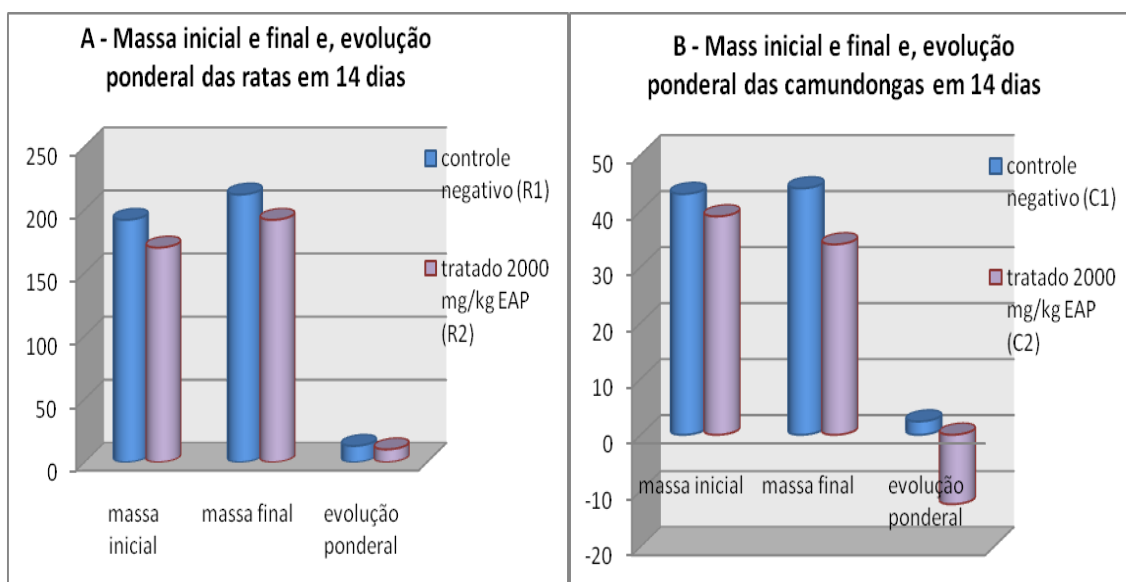


Figura 2 – Massa inicial e final e, evolução ponderal de ratas (R) e camundongas (C) tratadas com 2000 mg/kg do EAP (R2 e C2) e tratados com água destilada (R1 e C1), na toxicidade aguda.

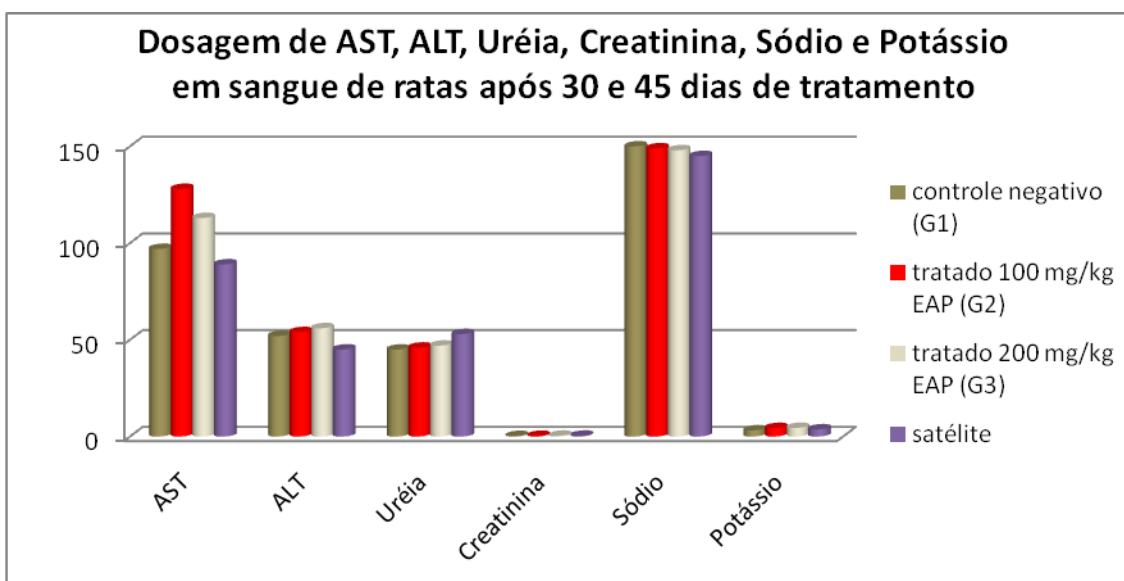


Figura 3 - Dosagem de AST (aspartato-aminotransferase), ALT (alanina-aminotransferase), ALP (fosfatase alcalina), Na⁺ (sódio), K⁺ (potássio), uréia e creatinina no soro de ratas tratadas com veículo (G1) e com diferentes doses do EAP (100 mg/kg – G2 e 200 mg/kg – G3) e satélite (G4 – 200 mg/kg).

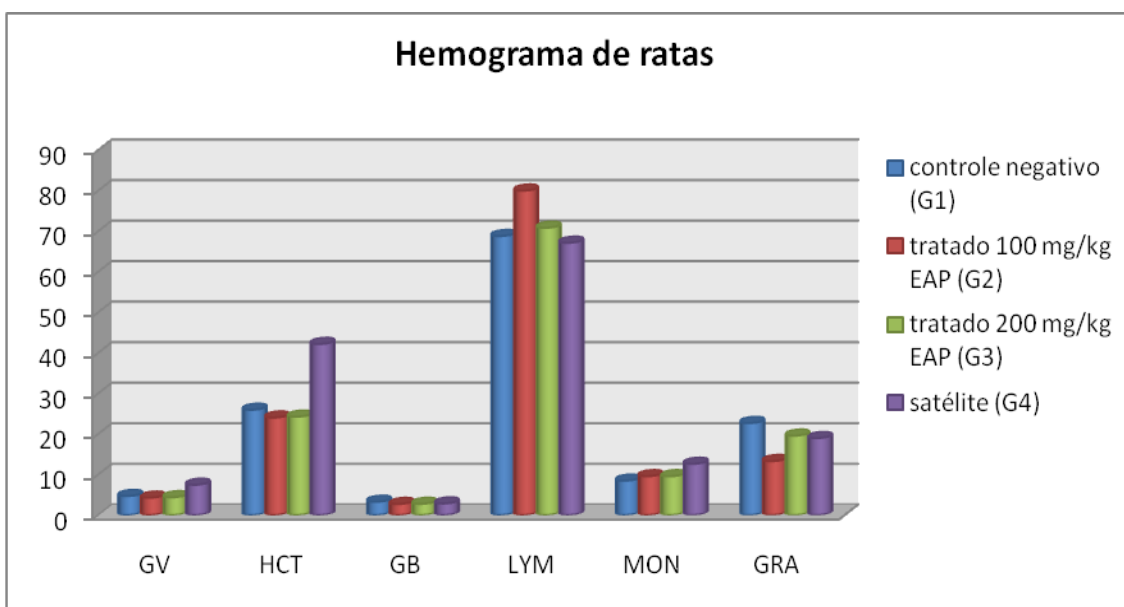


Figura 4 – Hemograma das ratas dos grupos: tratado com veículo (G1), tratado com diferentes doses do EAP (100 mg/kg – G2 e 200 mg/kg – G3) e satélite (G4 – 200 mg/kg).

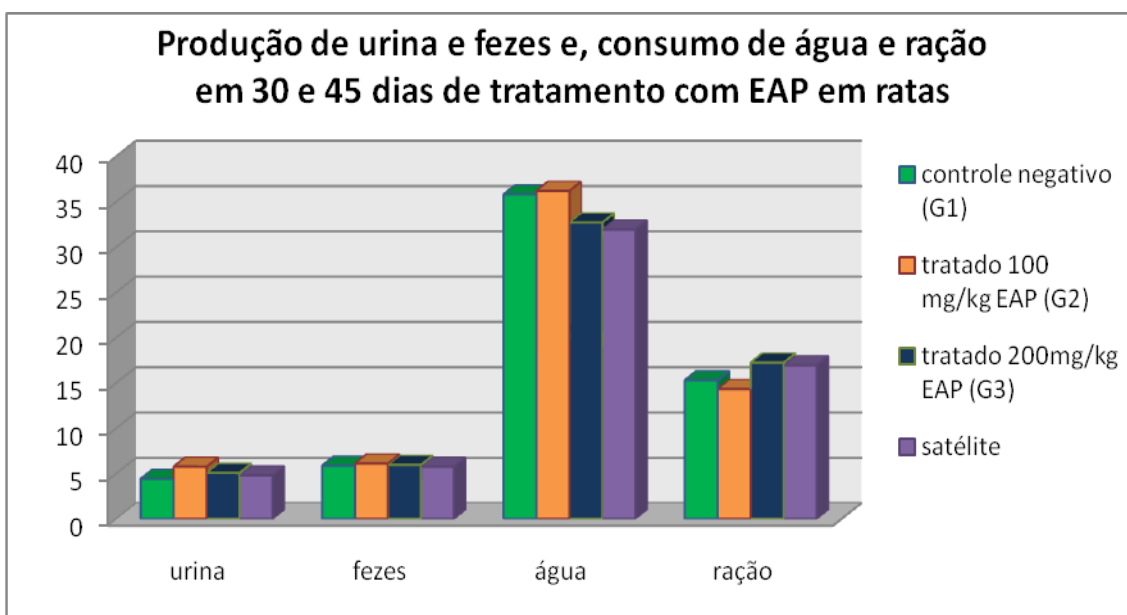


Figura 5 - Parâmetros avaliados durante 30 e 45 dias de tratamento com o EAP em ratas.

Fotos ilustrativas da espécie vegetal (*Lafoensia pacari*).



Flor, folha e fruto da espécie *Lafoensia pacari*

Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/cerrd/dedalei.htm>

http://w3.ufsm.br/herbarioflorestal/especie_detalhes.php?nome_filtrado=dedaleira



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 18 de fevereiro de 2013.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA PROTOCOLADO NA CEUA SOB Nº.068/12

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. Título do projeto: Avaliação da toxicidade aguda e subaguda de bioprodutos de plantas do cerrado aplicadas: *Pterodon emarginatus*; *Copaifera langsdorffii*; *Stryphnodendron adstringens* e *Lafoensia pacari*.

2. Pesquisador Responsável: Luiz Carlos da Cunha

3. Unidade/Órgão: Faculdade de Farmácia UFG, NEPET-UFG

4. Pesquisadores Participantes:

Anne Francielle Silva

Davi de Souza Melo

Dorcas Fernandes dos Anjos Melo

Edemilson Cardoso da Conceição

Jose Realino de Paula

Lidianne Quirino da Silva Gonzaga

Maria Teresa Freitas Bara

Marina Alves Coelho Silva

Sayonara ay More

5. Unidade onde será realizado: NEPET -NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS TÓXICO-FARMACOLOGICAS DA UFG

6. Data de Apresentação do Protocolo ao CEUA: 09/11/2012

7. Data de Atendimento das Pendências: 28/01/2013

II – Parecer do CEP:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Sugerimos a doação de outro método para amenizar o sofrimento dos animais que não seja a eutanásia.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



De acordo com a metodologia proposta no estudo, entende-se que há a necessidade de averiguar se os sinais clínicos decorrentes do uso dos bioprotutos são transitórios ou se evoluirão para morte do animal, sendo este um dado imprescindível para se promover ou não o desafio com a uma dosagem subsequente do bioproduto.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

III - Data da reunião: 18/02/13

Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Prof^a. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFG