



Efeito toxicológico do extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi* Ducke em ratos Wistar

Toxicological effect of *Pradosia huberi* Ducke hydroalcoholic extract in the Wistar rats

Recebido em 08/02/2010

Aceito em 16/07/2012

Aldeide de Oliveira Batista Rocha^{1*}, João Carlos Lima Rodrigues Pita¹, Kardilandia Mendes de Oliveira¹, Clélia de Alencar Xavier Mota¹, Ethiene Castelluci Esteveam¹, Waleska Pereira Viana¹, Rita de Cássia da Silveira e Sá² & Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz³

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal 5009, João Pessoa, Paraíba, 58051-970, Brazil

²Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal 5009, João Pessoa, Paraíba, 58051-970, Brazil

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal 5009, João Pessoa, Paraíba, 58051-970, Brazil

RESUMO

Pradosia huberi Ducke (Sapotaceae) é uma planta medicinal encontrada na Amazônia e usada para o tratamento de distúrbios gástricos. Este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade aguda e crônica do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *P. huberi* em ratos Wistar. Para o estudo de toxicidade aguda, os animais foram tratados por via oral durante 14 dias com dose única (2000 mg/kg), enquanto o grupo controle recebeu água destilada. A toxicidade crônica foi avaliada após administração oral em dose única e diária do veículo (água destilada) e do extrato (1,22, 6,1 e 30,5mg/kg), durante 90 dias. O estudo toxicológico agudo revelou alterações no consumo de água, ração e evolução ponderal (machos), e mudanças nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Os testes de toxicidade crônica expressaram diminuições no consumo de água em ambos os sexos, e ração (fêmeas tratadas), resultando na diminuição do peso corporal (machos e fêmeas). O exame microscópico do fígado dos animais tratados cronicamente revelou intoxicação por *P. huberi*. Tais alterações não comprometeram a saúde geral dos animais tratados nem foram observadas mortes durante o período experimental, sugerindo baixa toxicidade do extrato. Contudo, estudos pré-clínicos são necessários para avaliar os potenciais riscos mutagênicos e embriotóxicos dessa espécie.

Palavras-chaves: Farmacognosia, Fitoterapia, Roedores, Sapotaceae

ABSTRACT

Pradosia huberi Ducke (Sapotaceae) is a medicinal plant found in the Amazonian Forest and used for the treatment of gastric disorders. This study assessed the acute and chronic toxicity of the hydroalcoholic extract obtained from stem barks of *P. huberi* in Wistar rats. For the study of the acute toxicity, the animals were treated orally for 14 days with a dose of 2000 mg/kg, while the control group received distilled water. The chronic toxicity was evaluated with the oral administration of a single dose of the extract (1,22, 6,1 and 30,5mg/kg), during 90 days. The acute toxicology study revealed alterations in the consumption of water, ration and in the body weight in males, as well as changes in the biochemical and hematological parameters. The chronic toxicity revealed the decrease in the consumption of water in male and female rats, and the ration (treated females), resulting in decrease in the body weight of treated animals. The microscopic exam of the liver of the animals treated chronically revealed intoxication for *P. huberi*. Such alterations did not commit the general health of the treated animals and deaths were not observed during the experimental period, suggesting low toxicity of the extract. Preclinical studies are necessary to evaluate the potential mutagenics, and embryotoxic risks of this species.

Keywords: Pharmacognosy, Phytotherapy, Rodents, Sapotaceae

INTRODUÇÃO

A espécie *Pradosia huberi* Ducke (sinonímia *Glycoxylon huberi* Ducke) pertencente à família Sapotaceae é nativa da floresta Amazônica e conhecida popularmente como “casca doce” ou “pau doce” (Corrêa, 1986; Stevens, 2005). Apesar de poucos estudos que respaldem seu uso, *P. huberi* é uma planta que vem sendo utilizada pela

medicina popular, devido ao seu potencial terapêutico para doenças gastrointestinais (Kushima *et al.*, 2005).

Alguns constituintes químicos são comuns na família Sapotaceae, como flavonoides, óleos essenciais, triterpenos (Shah *et al.*, 2004), saponinas e taninos (Wandji *et al.*, 2003). Estudos fitoquímicos das cascas do

* Contato: Aldeide de Oliveira Batista Rocha, Rua Severino Massa Spinelli, 160, Tambá, Edifício Maison Francois apt° 901, CEP: 58039-210, João Pessoa, Paraíba, Brasil, (83) 3247-0918 e (83) 8812-2414, E-mail: aldeiderocha@lff.ufpb.br

tronco de *P. huberi* revelaram a presença dos seguintes flavonóides: 2,3-diidromiricetina 3- α -L-rhamnosídeo, astilbina, engelitina e 2,3-diidromiricetina (Jacquemin *et al.*, 1985), e 2,3-diidromiricetina-3-*O*-raminosídeo acetato e 2,3-diidromiricetina-7-*O*-raminosídeo acetato (Medeiros *et al.*, 2006).

Dentre os metabólitos vegetais, os flavonóides constituem uma classe de vasta representação no Reino Plantae. Uma extensa variedade de efeitos farmacológicos é atribuída aos flavonóides como: antimicrobiana, antiviral, citotóxica, antioxidante, antiulcerogênica, hipolipidêmica, antiplaquetária, anti-inflamatória, e antineoplásica (Volp *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2012). Dessa forma, os extratos de plantas têm atraído interesse de pesquisadores, relacionado à descoberta de novas drogas, mostrando-se promissores para o tratamento de diversas doenças (Dornas *et al.*, 2007). Apesar de sua aplicabilidade farmacológica, os compostos naturais também são capazes de exercer efeitos adversos. Por exemplo, estudos prévios evidenciaram que os flavonóides apresentaram efeito tóxico sobre o sistema reprodutor de ratos machos alimentados com dieta contendo 10% de óleo de Mahua (*Mandhuca latifolia*). A análise histopatológica indicou a ocorrência de atrofia testicular bilateral com mudanças degenerativas nos túbulos seminíferos de ratos tratados com o extrato de *M. latifolia*, que assim como *P. huberi*, espécie estudada, pertence à família Sapotaceae, sendo também rica em flavonoides (Rukmini, 1990).

Em razão do potencial tóxico que inúmeras plantas exibem, e considerando o vasto uso popular da espécie *P. huberi* como planta medicinal, o objetivo desse trabalho foi conduzir um estudo toxicológico agudo e crônico e dessa maneira avaliar o nível de segurança para o uso do extrato hidroalcoólico de *P. huberi* em ratos Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico e preparação do extrato

As cascas do caule de *P. huberi* foram coletadas na cidade de Porto Grande, Amapá, Brasil. A espécie foi identificada e uma exsiccata se encontra depositada no herbário amapaense (HAMAB), sob nº 012519, do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA).

A preparação do extrato foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (LTF-UFPB), onde o material sofreu secagem em estufa sob temperatura controlada (38°C), com posterior trituração em moinho mecânico, seguida de maceração com mistura de EtOH (70%): H₂O em temperatura ambiente (25-30°C) por 72 horas. Posteriormente, o preparado obtido foi filtrado e concentrado sob vácuo em rotaevaporador numa temperatura de 50°C até a obtenção do extrato hidroalcoólico (Farmacopéia Brasileira, 1988).

Animais

Ratos e ratas Wistar nulíparas e não grávidas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), pesando entre 200 a 300 g,

e com 90 dias, foram fornecidos pelo biotério Prof^o Dr. Thomas George, do LTF-UFPB. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, e mantidos sob condições controladas de temperatura de 21 \pm 2° C, tendo livre acesso à comida (ração tipo pellets Purina®) e água potável. A utilização dos animais foi realizada seguindo os princípios éticos (Andersen *et al.*, 2004), com aprovação em 16 de março de 2007 do protocolo experimental pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal LTF/UFPB sob nº 0203/07.

Toxicidade aguda

Os animais foram distribuídos em dois grupos (controle e tratado) com representantes de ambos os sexos (n=6), sendo tratados por via oral (gavagem) com dose única (2000 mg/kg) do extrato hidroalcoólico de *P. huberi*. O grupo controle recebeu tratamento com água destilada. Os animais foram acompanhados em busca de sinais tóxicos gerais e de mortalidade, aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após administração da dose única no primeiro dia e nos 14 dias seguintes, apenas uma vez por dia, sempre no mesmo horário (Brito, 1994). O consumo de água, ração e o peso corporal foram aferidos durante todo o período experimental.

Toxicidade crônica

A determinação das doses foi feita em concordância com a portaria de nº 116 da agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), e em doses utilizadas em estudo prévio que avaliou a atividade antiulcerogênica de *P. huberi* em ratos e camundongos (Brasil, 2004; Kushima *et al.*, 2005).

Ratos Wistar foram distribuídos em quatro grupos contendo 20 animais (10 machos e 10 fêmeas), sendo três tratados (T1=1,22, T2=6,1 e T3=30,5 mg/kg) com o extrato e um controle que recebeu água destilada, durante os 90 dias de experimentação. A ocorrência de sinais clínicos de toxicidade e de mortes, assim como o consumo de água e ração, foi observada diariamente. O peso corporal foi registrado semanalmente para construção da curva de evolução ponderal. A cada quinze dias foi aferida a temperatura retal com utilização de termômetro digital (MC – 3BC – ORON/China) e, uma hora após a administração do extrato, foi realizada análise comportamental, através do uso do aparelho de campo aberto. Através desse teste foram investigadas as atividades exploratórias dos animais, como a movimentação espontânea (ambulação), o número de comportamento de autolimpeza, de levantar os membros anteriores e a sua defecação. Além disso, a atividade motora dos animais foi avaliada com utilização do aparelho de Rota Rod, no qual foi registrado o tempo de permanência dos animais na barra giratória com velocidade mantida em 9,0 rpm (Almeida, 2006).

Decorridos 14 dias de experimentação (estudo agudo) e 90 dias (estudo crônico), os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e no 15° e 91° dia, respectivamente, foram sacrificados por dose excessiva de ketamina (König) com posterior sangria do plexo braquial, para coleta de sangue, sendo esta seguida de processamento hematológico e bioquímico.

Análise hematológica

As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos Vacutainer® com EDTA. A análise hematológica envolveu a contagem de hemácias, a determinação do hematócrito, a hemoglobina, o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). Já para a análise da série branca (leucograma), foi realizada a contagem geral de leucócitos, assim como a contagem diferencial de células e de plaquetas. As determinações foram feitas pelo analisador hematológico celular automático (SCIL Vet abx- Homba ABX®), para obtenção do hemograma e contagem de plaquetas. Os esfregaços sanguíneos foram corados automaticamente no HEMATEL 200 e analisados em microscópio Olympus.

Análise bioquímica

As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos Vacutainer® sem anticoagulante e com gel separador e ativador de coágulo para obtenção do soro. Após centrifugação, os parâmetros bioquímicos foram analisados por diferentes métodos: enzimático (glicose, uréia, ácido úrico, colesterol total, creatinina e triglicerídeos); cinético (aspartato aminotransferase – AST – e alanina aminotransferase – ALT); biureto (proteínas totais e albumina) e eletrodo íon seletivo (Na⁺, K⁺), empregando conjunto de métodos bioquímicos da Labtest.

Análise histopatológica

Após laparotomia, os órgãos (coração, fígado e rins) foram removidos, analisados macroscopicamente e pesados. Os pulmões e demais órgãos foram fixados em formalina (formol a 10%), para processamento em técnica histopatológica de rotina. Posteriormente, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 µm e corados com hematoxilina-eosina para análise.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças foram determinadas por meio dos testes “t” de Student, análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando p<0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo toxicológico agudo

O extrato hidroalcoólico de *P. huberi* apresentou baixa toxicidade aguda (2000 mg/kg), uma vez que não foram registrados sinais de toxicidade geral nem óbito durante todo o período experimental, sugerindo o não envolvimento do sistema nervoso central e autônomo (Almeida, 2006). No entanto, ocorreu o aumento da ingestão de água nas fêmeas tratadas. Já os machos tratados apresentaram diminuição no consumo de água e ração (Tabela 1) com comprometimento do peso corporal (Figura 1). Sabe-se, pois, que a toxicidade sistêmica pode ser identificada pela diminuição do peso corporal dos animais e por alterações no consumo de água e ração, sendo tais sinais importantes para a avaliação da

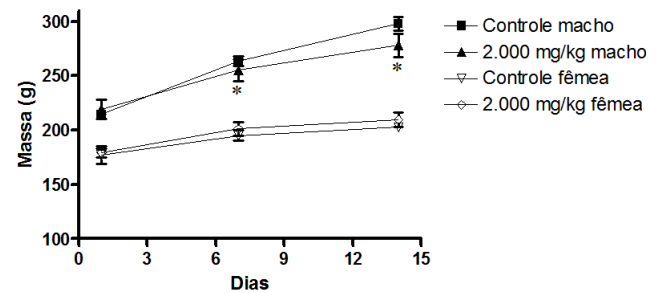
toxicidade de uma substância, pois fornece informações sobre o estado geral de saúde dos animais (Valadares, 2006).

Tabela 1. Consumo de água (mL) e ração (g) de ratos e ratas Wistar, tratados com a dose de 2000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *P. huberi*.

Parâmetros	EHA de <i>P. Huberi</i> (2000 mg/kg)	
	Controle	Tratado
<i>Machos</i>		
Consumo de água	259,2 ± 8,8	216,2 ± 8,4*
Consumo de ração	167,3 ± 8,4	139,1 ± 3,3*
<i>Fêmeas</i>		
Consumo de água	172,3 ± 6,4	203,1 ± 7,1*
Consumo de ração	97,7 ± 2,1	96,9 ± 2,3

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. (n=6) animais por sexo. Teste “t” de Student p<0,05.

Figura 1. Evolução ponderal (g) de ratos e ratas Wistar, tratados com a dose de 2000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *P. huberi*.



Os valores estão expressos em média ± e.p.m. N = 6 animais por sexo. Teste “t” de Student p<0,05.

Análise hematológica

A avaliação sanguínea é um importante indicador da fisiologia e patologia nos homens e animais e seus valores podem ser alterados pela ingestão de plantas tóxicas (Vázquez & Guerrero, 2007). Os parâmetros hematológicos foram mensurados nesse estudo após 15 dias de administração do extrato. Os machos tratados registraram diminuições significativas dos níveis de hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas, enquanto as fêmeas tratadas exibiram diminuições da CHCM (Tabela 2) e da contagem diferencial das células brancas, apenas do número dos linfócitos, quando comparados ao controle (dados não mostrados). Um estudo realizado para avaliação da toxicidade do extrato etanólico de *Kaempferia galanga*, utilizado como amebicida, evidenciou resultado semelhante quanto à diminuição do número dos linfócitos (Kanjapothi *et al.*, 2004).

Baixas concentrações de hemoglobina, hemácias e hematócrito podem indicar anemia, hemorragia recente ou retenção de líquido, causando hemodiluição. Já uma contagem diminuída de plaquetas (trombocitopenia) pode resultar de uma série de situações patológicas, como a destruição aumentada dessas células, devido ao uso de certas drogas, a desordens imunes, a coagulação vascular

disseminada e até lesões mecânicas (Dogan & Turkoglu, 2008). O diferencial de leucócitos é usado para avaliar a distribuição e a morfologia dos glóbulos brancos, fornecendo informações mais específicas sobre o sistema imune do que a contagem de leucócitos isoladamente (Failace, 2009). No entanto, as alterações apresentadas, nesse estudo, não comprometeram a fisiologia orgânica dos animais tratados.

Análise bioquímica

Da mesma maneira, as alterações bioquímicas das fêmeas tratadas (diminuição do triglicerídeo, AST e ácido úrico) apresentadas na tabela 3, provenientes do tratamento de 14 dias com o extrato, não comprometeram a fisiologia sistêmica dos animais. Além disso, nenhum efeito do tratamento agudo foi observado nos animais tratados (machos e fêmeas), em relação aos parâmetros eletrolíticos (sódio, potássio e magnésio) quando comparados ao controle (dados não mostrados). Contudo, a relevância clínica de tais achados produzidos pelo extrato de *P. huberi* não é conhecida e requer estudos mais extensivos.

Tabela 2. Parâmetros hematológicos obtidos do soro de ratos e ratas Wistar, tratados com a dose de 2000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *P. huberi*.

Parâmetros	EHA de <i>P. Huberi</i> (2000 mg/kg)	
	Controle	Tratado
<i>Machos</i>		
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,1 ± 0,2	7,4 ± 0,1*
Hemoglobina (g/dL)	16,9 ± 0,3	15,2 ± 0,2*
Hematócrito (%)	37,7 ± 0,8	35,4 ± 0,4*
VCM (μ^3)	46,5 ± 0,6	47,8 ± 0,3
HCM ($\mu\mu\text{g}$)	20,8 ± 0,4	20,6 ± 0,2
CHCM (%)	44,7 ± 0,4	43,0 ± 0,7
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	1207,0 ± 39,3	995,0 ± 79*
<i>Fêmeas</i>		
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	7,1 ± 0,1	7,2 ± 0,2
Hemoglobina (g/dL)	15,8 ± 0,2	15,3 ± 0,2
Hematócrito (%)	33,3 ± 0,4	33,9 ± 0,6
VCM (μ^3)	46,8 ± 0,4	46,6 ± 1,0
HCM ($\mu\mu\text{g}$)	21,0 ± 0,5	22,2 ± 0,3
CHCM (%)	47,4 ± 0,6	45,0 ± 0,4*
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	1117,0 ± 149,0	1183,0 ± 68,0

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. N = 6 animais por sexo. Teste “t” de Student p < 0,05.

Análise macroscópica

Após administração oral do extrato na dose de 2000 mg/kg, nenhuma alteração no peso e morfologia dos órgãos (coração, pulmões, fígado e rins) foi observada em relação ao grupo controle (dados não mostrados), sugerindo uma baixa toxicidade dessa planta em ratos Wistar. Em contraste, testes toxicológicos agudos evidenciaram uma elevada toxicidade do extrato etanólico de *P. huberi*, quando administrado por via intraperitoneal em camundongos, através de alterações comportamentais e no peso dos órgãos dos animais, bem como pelas mortes

registradas (Medeiros *et al.*, 2010).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos e ratas Wistar, tratados com a dose de 2000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *P. huberi*.

Parâmetros	EHA de <i>P. Huberi</i> (2000 mg/kg)	
	Controle	Tratado
<i>Machos</i>		
Glicose (mg/dL)	86,0 ± 10,0	84,8 ± 9,8
Uréia (mg/dL)	34,0 ± 1,3	35 ± 2,1
Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,0
Colesterol (mg/dL)	44,7 ± 2,8	45,6 ± 2,9
Triglicerídeos (mg/dL)	115,5 ± 7,9	103 ± 19
AST (U/L)	149,5 ± 8,2	137,6 ± 7,8
ALT (U/L)	55,2 ± 2,0	58,2 ± 3,0
Ácido úrico (mg/dL)	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,0
Proteínas totais (g/dL)	6,6 ± 0,1	6,3 ± 0,1
Albumina (g/dL)	3,7 ± 0,0	3,6 ± 0,1
<i>Fêmeas</i>		
Glicose (mg/dL)	70,6 ± 3,0	70,0 ± 3,0
Uréia (mg/dL)	38,5 ± 3,0	39,0 ± 2,6
Creatinina (mg/dL)	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Colesterol (mg/dL)	44, ± 3,1	51,0 ± 5,0
Triglicerídeos (mg/dL)	80,0 ± 4,7	64,0 ± 3,8*
AST (U/L)	147,0 ± 6,7	120,0 ± 4,7*
ALT (U/L)	54,3 ± 4,2	56,3 ± 4,5
Ácido úrico (mg/dL)	1,3 ± 0,0	0,6 ± 0,1*
Proteínas totais (g/dL)	6,6 ± 0,1	6,7 ± 0,1
Albumina (g/dL)	3,7 ± 0,1	3,6 ± 0,1

Os valores estão expressos em média ± e.p.m. N = 6 animais por sexo. Teste “t” de Student p < 0,05.

Estudo toxicológico crônico

Durante os 90 dias de tratamento, não foram observados sinais indicativos de toxicidade, e nenhuma morte foi registrada nos grupos controle e tratados (T1=1,22, T2=6,1 e T3=30,5 mg/kg).

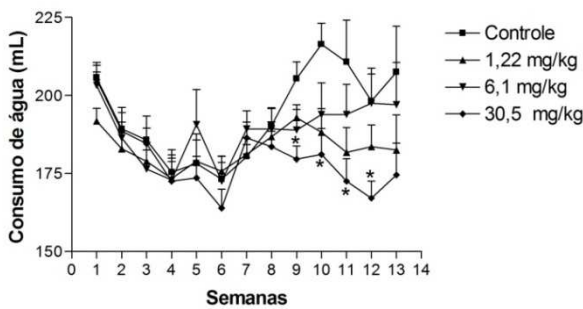
O consumo de água diminuiu significativamente nos machos, na 9^a, 10^a, 11^a e 12^a semanas (Figura 2), e nas fêmeas na 9^a e 10^a semanas (Figura 3), todos tratados com a maior dose (30,5 mg/kg). Nos machos, o consumo de ração não foi alterado pelo tratamento (Figura 4), enquanto nas fêmeas, o consumo de ração foi diminuído nas três doses administradas. Ainda as fêmeas que receberam a dose equivalente a 1,22 mg/kg apresentaram aumento isolado durante a 5^a semana de tratamento, e as que receberam as doses de 6,1 e 30,5 mg/kg expressaram diminuições significativas em quase todas as semanas de experimentação (Figura 5). Já o peso corporal, após a administração do extrato na dose de 1,22 mg/kg, causou diminuição significativa do peso dos ratos durante a 3^a e 6^a semanas (Figura 6), enquanto, nas fêmeas tratadas com a dose de 6,1 mg/kg, houve diminuição significativa do peso corporal durante a 2^a, 3^a, 4^a, 10^a e 11^a semanas de tratamento (Figura 7).

Inúmeros hormônios peptídicos estão envolvidos no controle da ingestão de água e de alimento e no balanço

energético (Wren *et al.*, 2001). Estudo realizado em ratos Wistar revelou que o hormônio grelina (estimulante do apetite) com sítios de ação em áreas hipotalâmicas atenuou o consumo de água nos machos tratados com solução salina hipertônica (Mietlick *et al.*, 2010). Além disso, a administração oral do antagonista da grelina na dieta de camundongos obesos conduziu à redução no consumo de alimento e peso corporal, devido à perda de massa gorda, comprovando o envolvimento desse peptídeo no processo de alimentação e ingestão de água (Esler *et al.*, 2007).

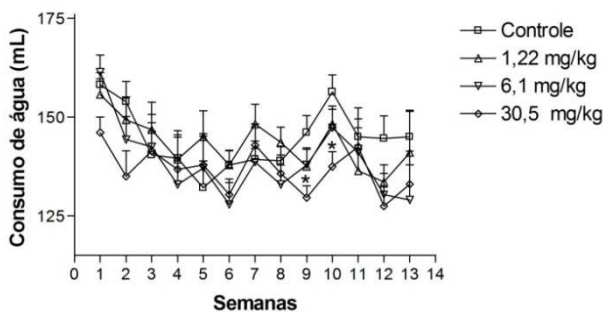
Apesar de as alterações apresentadas no presente estudo terem sido mínimas, não induzindo mortes nos animais tratados, e de todos os valores alterados terem se normalizado, ficando iguais aos níveis apresentados pelo grupo controle ao final do período experimental, os dados obtidos no tratamento crônico merecem atenção, uma vez que a alteração no consumo de água e de ração e o comprometimento do peso corporal também ocorreram no estudo toxicológico agudo, sugerindo envolvimento dos centros reguladores da fome e da sede. A alteração do peso corporal é um parâmetro utilizado nos ensaios toxicológicos como um indicador dos efeitos adversos de drogas e substâncias químicas (Teo *et al.*, 2002).

Figura 2 . Consumo semanal de água (mL) de ratos tratados com diferentes doses do extrato hidroacóico de *P. huberi* durante ensaio de toxicidade crônica.



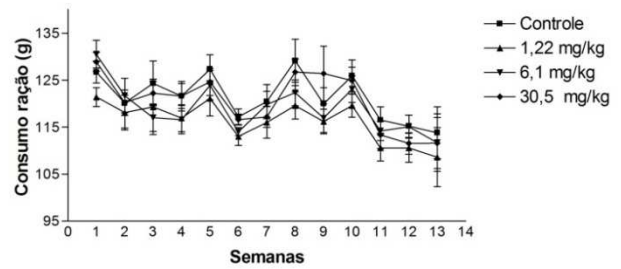
Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. N=10. ANOVA/ Dunnett, * $p < 0,05$.

Figura 3 . Consumo semanal de água (mL) de ratas tratadas com diferentes doses do extrato hidroacóico de *P. huberi* durante ensaio de toxicidade crônica.



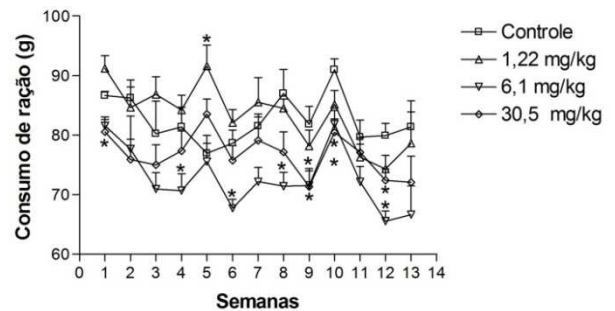
Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. N=10. ANOVA/ Dunnett, * $p < 0,05$.

Figura 4. Consumo semanal de ração (g) em ratos tratados com diferentes doses do extrato hidroacóico de *P. huberi* durante ensaio de toxicidade crônica.



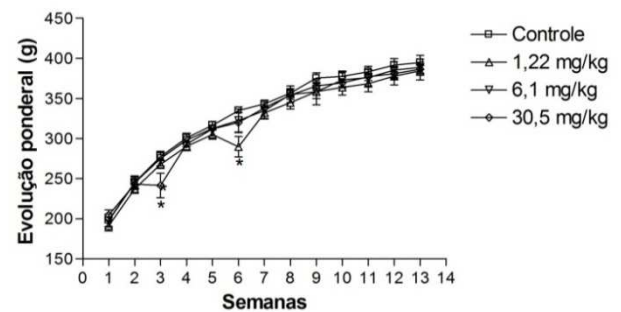
Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. N=10. ANOVA/ Dunnett, * $p < 0,05$.

Figura 5 . Consumo semanal de ração (g) de ratas tratadas com diferentes doses do extrato hidroacóico de *P. huberi* durante ensaio de toxicidade crônica.



Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. N=10. ANOVA/ Dunnett, * $p < 0,05$.

Figura 6 . Evolução ponderal (g) de ratos tratados com diferentes doses do extrato hidroacóico de *P. huberi* durante ensaio de toxicidade crônica.

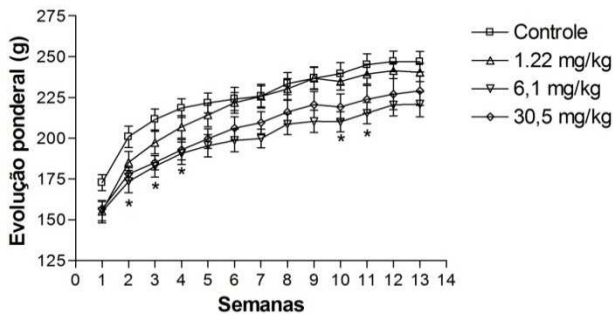


Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. N=10. ANOVA/ Dunnett, * $p < 0,05$.

Temperatura Corporal

A temperatura corporal dos machos e das fêmeas não sofreu mudança significativa estatisticamente com os tratamentos (dados não mostrados).

Figura 7 – Evolução ponderal (g) de ratas tratadas com diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *P. huberi* durante ensaio de toxicidade crônica.



Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. N=10. ANOVA/ Dunnett, * $p < 0,05$.

Análise da atividade motora e comportamental

A avaliação da atividade motora com o aparelho de Rota Rod não registrou alterações significativas causadas pelo tratamento prolongado com o extrato hidroalcoólico de *P. huberi* (dados não mostrados). No entanto, foi observada alteração no índice de emocionalidade através do aumento do número de ambulações ($40,6 \pm 4,8$), durante a 4ª semana, e do comportamento de levantar ($21,4 \pm 2,0$), durante a 2ª semana, nas fêmeas tratadas com a dose de 30,5 mg/kg, quando comparados aos grupos controles da 4ª semana ($26,4 \pm 4,1$) e da 2ª semana ($13,4 \pm 2,1$), ambos normalizados com o decorrer do tratamento. A quantidade de bolos fecais e o comportamento de autolimpeza não foram alterados de forma significativa nos grupos tratados e controle, em ambos os sexos (dados não mostrados).

Análise hematológica

O sangue é um importante indicador do status fisiológico e patológico dos animais (Oduola *et al.*, 2007). Nos exames hematológicos representados pelo hemograma e contagem de plaquetas, o tratamento com o extrato de *P. huberi* alterou de forma significativa a quantidade de hemoglobina (Tabela 4) e monócitos (dados não mostrados) de fêmeas tratadas, respectivamente, com as doses de 6,1 e 1,22 mg/kg, enquanto os demais parâmetros hematológicos não apresentaram alterações significativas em ambos os sexos. Resultado semelhante foi apresentado com aumento da hemoglobina em ratos Wistar, machos e fêmeas, após tratamento crônico com o extrato de *Hunteria umbellata* (Adeneye *et al.*, 2010). Apesar de a análise hematológica ter mostrado alterações significativas, tais resultados não foram dependentes da dose e não expressaram mudanças fisiológicas. Estes dados são de pouca relevância clínica e sugerem baixa toxicidade do extrato, uma vez que não houve comprometimento da saúde geral dos animais.

Análise bioquímica

A administração oral do extrato de *P. huberi* alterou o perfil bioquímico dos animais tratados com a dose de 30,5 mg/kg (Tabela 5), através do aumento dos níveis de

glicose para ambos os sexos e albumina apenas para os machos tratados. Os valores das enzimas AST e ALT sofreram aumento significativo apenas para as fêmeas tratadas. Entre os eletrólitos avaliados (sódio, potássio e magnésio), somente o magnésio sofreu diminuição em sua concentração em machos e fêmeas tratados com a maior dose do extrato (30,5 mg/kg) (dados não mostrados). Um estudo prévio com o extrato aquoso metanólico de *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) mostrou o aumento dos níveis séricos das enzimas AST e ALT após tratamento com altas doses (12 e 16 g/kg) do extrato, sendo indicativo de dano ao tecido hepático (Assam *et al.*, 2010). O fígado é responsável pela metabolização de todos os xenobióticos ingeridos, além de regular o nível de glicose e das transaminases AST e ALT, sendo tais enzimas liberadas no sangue na ocorrência de dano à membrana do hepatócito, o que resulta em aumento de sua permeabilidade. Portanto, os níveis enzimáticos de AST e ALT podem ser utilizados para avaliar a função hepática (Hilaly *et al.*, 2004).

Análise histopatológica

A análise patológica dos órgãos (coração, fígado, rins e pulmões) de machos e fêmeas tratados com as diferentes doses do extrato de *P. huberi* apresentou, no fígado dos ratos tratados com a maior dose (30,5 mg/kg), alterações histopatológicas (necrose e afluxo de linfócitos). Resultado semelhante foi apresentado na avaliação toxicológica do extrato etanólico de *Synadenium umbrellatum* Pax, que revelou infiltrado linfocítico no fígado de ratos (Cunha *et al.*, 2009). Os dados histopatológicos de *P. huberi* corroboram com a análise bioquímica, pois lesões nos hepatócitos são acompanhadas do aumento das transaminases AST e ALT. Porém, as agressões hepáticas descritas se apresentaram de forma discreta e local e foram apresentadas para o grupo de animais que recebeu a maior dose, sendo esta 25 vezes superior à dose usual. Entretanto, não é aconselhável a total desconsideração histotóxica desse produto sobre o fígado, merecendo maiores esclarecimentos sobre os mecanismos de ação envolvidos.

Figura 8. Necrose hepatocelular lobular focal A (seta larga) associada a afluxo de linfócitos e histiócitos B (seta delgada) Hematoxilina-eosina X250.

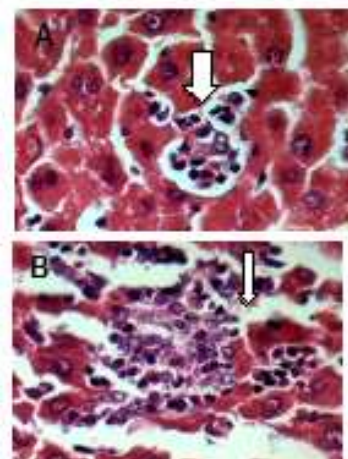


Tabela 4. Parâmetros hematológicos obtidos do soro de ratos e ratas Wistar, tratados com as diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *P. huberi*.

Parâmetros	EHA de <i>P. Huberi</i> (mg/kg)			
	Controle	1,22	6,1	30,5
Machos				
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	7,8±0,2	7,6±0,5	8,5±0,2	8,3±0,2
Hemoglobina (g/dL)	14,6±0,4	13,6±0,8	15,6±0,2	15,1±0,5
Hematócrito (%)	35,0±1,2	33,0±2,2	37,2±0,5	38,0±0,6
VCM (μ ³)	44,5±0,7	43,1±0,6	43,9±0,7	45,3±0,7
HCM (μg)	18,7±0,3	18,0±0,3	18,4±0,4	18,3±0,3
CHCM (%)	42,0±0,5	41,5±0,6	41,9±0,5	40,5±1,0
Plaquetas (10 ⁶ /mm ³)	962,2±60,6	951,7±77,6	932,7±51,4	998,9±79,3
Fêmeas				
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	7,6±0,2	8,1±0,2	8,3±0,3	7,8±0,1
Hemoglobina (g/dL)	7,6±0,2	8,1±0,2	8,3±0,3*	7,8±0,1
Hematócrito (%)	34,5±1,0	37,6±1,5	38,0±1,1	35,4±0,4
VCM (μ ³)	45,8±0,6	46,5±1,0	46,0±0,7	45,2±0,5
HCM (μg)	19,2±0,3	19,0±0,4	19,7±0,4	18,7±0,2
CHCM (%)	42,1±0,4	40,9±0,3	42,7±0,4	41,4±0,5
Plaquetas (10 ⁶ /mm ³)	832,7±42,8	790,0±63,5	730,8±74,6	844,7±74,2

Os valores estão expressos em média ±e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnett, *p<0,05.

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos e ratas Wistar, tratados com as diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *P. huberi*.

Parâmetros	EHA de <i>P. Huberi</i> (mg/kg)			
	Controle	1,22	6,1	30,5
Machos				
Glicose (mg/dL)	111,3±6,9	109,8±1,7	125,0±9,3	142,7±7,5*
Ureia (mg/dL)	39,8±1,1	44,3±4,6	34,2±0,9	38,3±1,2
Creatinina (mg/dL)	0,5±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	0,4±0,0
Colesterol (mg/dL)	46,8±2,0	48,5±6,4	60,5±3,4	61,8±6,3
Triglicerídeos (mg/dL)	125,8±8,8	143,2±20,5	112,7±12,4	143,2±21,5
AST (U/L)	162,2±6,3	142,8±9,6	312,7±104,0	204,5±13,5
ALT (U/L)	95,5±22,1	89,8±18,2	215±117,1	77,7±3,7
Ácido úrico (mg/dL)	0,8±0,2	0,7±0,2	0,6±0,1	0,8±0,1
Proteínas totais (g/dL)	6,4±0,1	6,4±0,1	6,7±0,1	6,9±0,2
Albumina (g/dL)	2,8±0,1	2,8±0,1	3,0±0,1	3,2±0,1*
Fêmeas				
Glicose (mg/dL)	98,7±8,7	103,0±5,0	125,0±9,3	132,8±7,6*
Ureia (mg/dL)	39,±2,7	40,3±2,1	34,2±0,9	37,8±3,5
Creatinina (mg/dL)	0,4±0,0	0,4±0,0	0,5±0,0	0,4±0,0
Colesterol (mg/dL)	49,8±4,4	56,8±4,4	60,5±3,4	63,7±11,8
Triglicerídeos (mg/dL)	113,3±17,6	80,0±19,1	112,7±12,4	95,3±29,9
AST (U/L)	170,2±15,3	293,8±92,5	312,7±104,0	601,0±190,0*
ALT (U/L)	57,5±8,5	82,3±13,6	215,7±117,1	174,2±59,3*
Ácido úrico (mg/dL)	0,7±0,1	0,8±0,1	0,6±0,1	1,0±0,1
Proteínas totais (g/dL)	6,7±0,2	6,4±0,1	6,7±0,1	6,9±0,2
Albumina (g/dL)	3,3±0,1	3,2±0,1	3,1±0,04	3,2±0,2

Os valores estão expressos em média ±e.p.m. (n=10). One-way ANOVA/Dunnett, *p<0,05.

CONCLUSÕES

A toxicidade aguda e crônica oral do extrato hidroalcoólico de *P. huberi* é relativamente baixa, uma vez que nenhum sinal de toxicidade sistêmica foi expresso a ponto de comprometer a saúde geral ou mesmo levar a óbito os animais tratados. Contudo sua capacidade em alterar parâmetros hematológicos e bioquímicos, assim como a ingestão de água e alimentos, afetando a evolução ponderal, e de causar danos hepáticos deve ser considerada em estudos futuros.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES/UFPA pelo suporte financeiro fornecido e ao IEPA-AM, pelo material vegetal cedido.

REFERÊNCIAS

Adeneye AA, Adeyemi OO, Agbaje EO, Banjo AAF. Evaluation of the toxicity and reversibility profile of the aqueous seed extract of *hunteria umbellata* (k. schum.)

hallier f. in rodents. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 7(4):350-369, 2010.

Almeida, R. N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 357 p.

Andersen ML, D' Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik S. Princípios Éticos do Uso de Animais de Experimentação. São Paulo: UNIFESP, 2004, 167 p. Assam JPA, Dzoyem JP, Pieme CA, Penlap VB. In vitro antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn. (Malvaceae). *BMC Complement. Altern. Med.* 10(40): 1-7, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Específica (RE)

nº 90, de 16 de março de 2004.

Brito AS. Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo. Campinas: Editora da UNICAMP, 1994, p. 122.

Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio. 6: 1926-1978, 1986.

Cunha LC, Azeredo FS, Mendonça ACV, Vieira MS, Pucci LL, Valadares MC, Freitas HOG, Sena AAS, Junior RSL. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19:403-411, 2009.

Dornas WC, Oliveira TT, Rodrigues-Das-Dores RG, Santos AF, Nagem TJ. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 28: 241-249, 2007.

Dougan S & Turkoglu I. Iron-deficiency anemia detection from hematology parameters by using decision trees. *International Journal of Science & Technology.* 3(1): 85-92, 2008.

Esler WP, Rudolph J, Claus TH, Tang W, Barucci N, Brown SE, Bullock W, Daly M, Decarr L, Li Y, Milardo L, Molstad D, Zhu J, Gardell SJ, Livingston JN, Sweet LJ. Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinol.* 148:5175-85. 2007.

Failace R. Hemograma: manual de interpretação. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 424 p.

Farmacopéia Brasileira. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, v. 2, 1988.

Hilaly JE, Israili ZH, Llyoussi B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 91: 43-50, 2004.

Jackquemin H, Boissannat A, Faugeras G, Tillequin F, Delaveau P. Flavonóides de *Glycoxyllon huberi* Ducke. *Ann Pharmaceutiques Françaises.* 259: 27-36, 1985.

Kanjanapothi D, Panthong A, Lertprasertsuke N, Taesotikul T, Rujjanawate C, Kaewpinit D, Sudthayakorn R, Choochote W, Chaithong U, Jitpakdi A, Pitasawat B.

Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom). *Journal of Ethnopharmacology*. 90(2-3): 359-365, 2004.

Kushima H, Hiruma-Lima CA, Santos MA, Viana E, Coelho-Ferreira M, Brito ARMS. Gastroactive activity of *Pradosia huberi* on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls and nitric oxide. *J. Ethnopharmacol.* 101:61-67, 2005.

Medeiros FA, Medeiros AAN, Tavares JF, Queiroga KF, Costa VCO, Silva MS. Flavononóis Acetilados de *Pradosia huberi* Ducke (Sapotaceae). In: 29 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

Medeiros NA, Medeiros FA, Queiroz TM, Tavares JF, Silva MS, Medeiros IA. Effects of extract, fractions and 2,3-dihydromyricetin-3-O- α -L-rhaminoside from *Pradosia huberi* (Ducke) Ducke on rat isolated mesenteric arteries. *Braz. J. Pharmacogn.* 20:542-548, 2010.

Nunes CR, Bernardes NR, Glória LL, Oliveira DB. *Vértices*. 14:39-57, 2012.

Oliveira TT, Silva RR, Dornas WC, Nagem TJ. Flavonoides e aterosclerose. *R.B.A.C.* 42:49-54, 2010.

Oduola T., Adeniyi, F.A.A., Ogunyemi, E.O., Bello, I.S., Idowu, T.O., Subair, H.G. Toxicity studies on an unripe *Carica papaya* aqueous extract: biochemical and haematological effects in Wistar albino rats. *J. Medicinal Plant Research* 1(1): 001-004, 2007.

Rukmini C, reproductive toxicology and nutritional studies on manhua oil (*Mandhuca latifolia*). *Food and Chemical Toxicology*. 28(9): 601-605, 1990.

Shah MB, Goswami SS, Santani DD. *Phytother. Res.* 18, 814. 2004.

Stevens PF. *Angiosperm Phylogeny* website. Version 6, 2005.

Teo S, Stirling D, Thomas S, Hoberman A, Kiorpes A, Khetani V. A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 179 (30): 183-196. 2002.

Valadares MC. Avaliação de toxicidade aguda: estratégia após a "Era do Teste DL₅₀". *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3(2): 93-98, 2006.

Vázquez GR & Guerrero GA. Characterization of blood cells and hematological parameters

in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue & Cell*. 39: 151-160, 2007.

Volp ACP, Renhe IRT, Barra K, Stringueta PC. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Rev. Bras. Nutr. Clin.* 23:141-149, 2008.

Wandji J, Tillequin F, Mulholland D.A. *Phytochemistry*, 64: 845. 2003.

Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin

enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:5992. 2001.